

Über die Beeinflussung
einiger Fermentaktivitäten
durch Insulin und SH-Glutathion

Ein Beitrag zur Wirkungsweise des Insulins

Rolf Schumacher

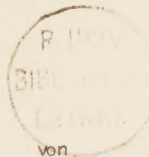
Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e m a n n

Über die Beeinflussung einiger Fermentaktivitäten

durch Insulin und SH-Glutathion

Ein Beitrag zur Wirkungsweise des Insulins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München



Rolf Schumacher
aus
Weilheim (Teck)

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e m a n n

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
I. Einleitung	1
II. Schrifttum	2
III. Methodik	12
a) Allgemeines	12
b) Bestimmung der Glukose-Aufnahme	12
c) Die Blutzuckerbestimmung	15
d) Glukose-6-Phosphatase-Aktivität	15
e) ATP-ase-Aktivität	19
f) Bestimmung der Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität	19
g) Eiweißbestimmung	22
IV. Ergebnisse	24
V. Diskussion	42
VI. Zusammenfassung	45
VII. Literaturverzeichnis	49
Lebenslauf	53



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Seit den grundlegenden Versuchen von M e h r i n g und M i n k o w s k y (1889) ist bekannt, daß das Pankreas neben der Bildung von Verdauungsfermenten auch für die Regulierung des Zuckerhaushaltes bedeutungsvoll ist. L a n g e r h a n s erkannte zwanzig Jahre später als innersekretorisch wirksames Gewebe die "Pankreas-Inseln".

Bereits 1908 wurde das Insulin von dem Deutschen Z ü l z e r zwar dargestellt, jedoch in seiner wahren Bedeutung erst 1921 von B a n t i n g und B e s t erkannt und in weitgehend gereinigter Form zur Darstellung und damit zur allgemeinen Anwendung gebracht.

Seiner chemischen Natur nach ist Insulin ein Polypeptid, dessen komplizierte Strukturformel heute geklärt ist. Mehrere Disulfid-Brücken zwischen den Peptidketten sind für seine chemische Struktur charakteristisch. Außerdem befindet sich eine besonders leicht reduzierbare Disulfid-Brücke innerhalb einer Peptidkette des Insulinmoleküls.

Das ausgeprägteste Merkmal der Insulinwirkung auf den Organismus ist die eingangs erwähnte Regulation des Kohlehydrathaushaltes und damit zusammenhängend die Senkung des Blutzuckerspiegels.

So bekannt diese allgemeinen physiologischen Wirkungen des Insulins auch sind, so umstritten ist sein biochemischer Wirkungsmechanismus.

Die komplizierte hormonale Regulierung des Zuckerhaushaltes erschien lange Zeit durch die Versuche von C o r i u.M. (1) dahingehend geklärt, daß Insulin in vitro und in vivo die Hexokinase-reaktion entgegen der Hemmung durch das Wachstumshormon (STH) und der NNR-Hormone sicherstellt.

Mit dieser Wirkungsweise lassen sich jedoch viele neueren Befunde nicht ohne weiteres in Einklang bringen.

Schon auf Grund seiner chemischen Eigenschaften scheint das Insulin als ein Disulfid-Brücken enthaltendes Agens ungeeignet, ein SH-Ferment wie die Hexokinase zu stimulieren. Im Gegenteil sprechen zahlreiche Ergebnisse dafür, daß diese Disulfid-Brücken SH-Gruppen oxydieren und dadurch SH-Fermente inaktivieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Möglichkeiten untersucht werden, die zu einer Klärung dieses Widerspruches führen könnten.

II. S c h r i f t t u m

Wie eingangs erwähnt ist es schon lange bekannt, daß das Insulin im Kohlehydratstoffwechsel eine zentrale und lebenswichtige Wirkung entfaltet.

Trotz intensiver Forschungsarbeit auf diesem Gebiet besteht bis heute keine Übereinstimmung darüber, an welchem Punkt im Kohlehydratstoffwechsel diese lebenswichtige Wirkung des Insulins ansetzt.

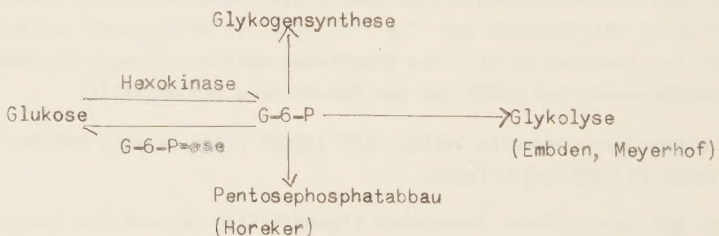
Um den Überblick zu wahren, seien zunächst die grundlegenden Vorgänge beim Zuckerstoffwechsel dargelegt.

Nach unseren heutigen biochemischen Kenntnissen wandelt sich jedes Glukosemolekül zu Glukose-6-Phosphat um und nimmt erst dann am Zellstoffwechsel teil.

Dabei ist wichtig, daß das Glukose-6-Phosphat (G-6-P) Ausgangsverbindung sowohl für die Glykogensynthese als auch für die Glykolyse (E m b d e n M e y e r h o f) und für den Pentose-Phosphatabbau (H o r e k e r) darstellt.

Glukose-6-Phosphat steht daher im Zentrum des intermediären Zuckerhaushalts, da von ihm drei chemische Reaktionsrichtungen ausgehen.

In dem folgenden Schema werden diese Zusammenhänge noch einmal zum Ausdruck gebracht.



Zwei Fermentsysteme beeinflussen die Ausbeute an gebildetem G-6-P, einmal die Hexokinase, die die Anlagerung von Phosphorsäure aus ATP am C⁶-Atom der Glukose bewirkt und zum anderen die Glukose-6-Phosphatase (G-6-P-ase), die das G-6-P wieder dephosphoryliert.

Nach dem obigen Schema bedeutet eine hohe Hexokinaseaktivität einen erhöhten Glukosedurchsatz. Andererseits könnte eine Beschleunigung dieses Glukosedurchsatzes auch durch eine Hemmung der G-6-P-ase zustandekommen.

Da C o r i u.M. (1) in vitro und in vivo unter Insulineinfluß diesen Glukosedurchsatz beschleunigt sahen, nahmen sie als spezifische Insulinwirkung die Aktivierung der Hexokinase an. Die Glukoseaufnahme in vitro und in vivo hat man deshalb nach C o r i als ein Maß angenommen für die Glukoseverwertung durch die Körperzelle, sei es nun in Richtung Glykolyse oder Glykogensynthese.

C o r i u.M. (1) fanden die Glukoseaufnahme durch isoliertes Rattenzwerchfell unter Insulinzusatz um 29% gesteigert. Das diabetische Rattenzwerchfell zeigte dagegen eine um 59% gehemmte Glukoseaufnahme, die unter Insulinzusatz wieder normalisiert wurde.

Adrenalektomie normalisierte beim diabetischen Tier die Glukoseaufnahme, die durch Insulinzusatz über die Norm anstieg. C o r i (1) schließt daraus, daß in der Nebenniere ein Faktor gebildet wird, der die Hexokinase hemmt.

P a r k u. K r a h l (2) verabreichten 3 Stunden vor der Tötung jede Stunde 3 mg Wachstumshormon (STH) intraperitoneal und fanden danach die Glukoseaufnahme durch Zwerchfell normaler Ratten gehemmt; bei hypophysektomierten Tieren wurde dagegen die um 23 % gesteigerte Glukoseaufnahme durch das STH wieder normalisiert und sank bei gleichzeitiger Anwendung von NNR-Extrakt unter den Kontrollwert.

Diese Befunde wurden durch V i l l e e u.a. (3) und durch P e r l m u t t e r u.M. (4) bestätigt.

S t a d i e u.M. (5) konnten darüber hinaus an hypophysektomierten oder adrenalektomierten Ratten durch längere gleichzeitige Verabreichung von Wachstumshormon (STH) und Cortison den verstärkenden Effekt des Insulins auf die Glukoseaufnahme einschränken, während dieser in den oben genannten Arbeiten bei jeder Vorbehandlung prozentual gleichgeblieben war.

In mehreren neueren Arbeiten sind ähnliche Ergebnisse gefunden worden. Dabei wurde versucht, den Insulineffekt auf isoliertes Rattenzwerchfell, das in Serum entsprechend vorbehandelter Ratten (6) oder Katzen (7) inkubiert wurde, zu beeinflussen.

Da jedoch mit einem so komplexen System, wie es das Serum darstellt, sicher auch eine große Zahl von Nebenwirkungen auftreten, scheint diese Methode nicht

in jedem Fall geeignet zu sein, ein klares Bild von der Insulinwirkung zu schaffen.

Die seither angeführten Arbeiten begründeten im wesentlichen die Auffassung, daß das Insulin in jeder einzelnen Zelle die Hexokinase-reaktion entgegen diesem hemmenden Einfluß von STH und NNR-Hormonen sicherstellt.

Viele biochemische Befunde sind nicht ohne weiteres mit dieser Hexokinase-theorie in Einklang zu bringen. Insbesondere die Tatsache, daß Insulin seiner chemischen Struktur nach ungeeignet erscheint, gerade die Hexokinase zu aktivieren, da diese von S o l s u.M. (8) als ein SH-Ferment erkannt wurde. L i n d l e y (9) stellte nämlich fest, daß die im Insulinmolekül enthaltenen Disulfid-Brücken durch Lithiumthioglykolat leicht reduzierbar sind.

Die bekannte Erscheinung, daß irgendeine biochemisch aktive Substanz irgendeine biochemische Reaktion in kleinen Dosen stimuliert, aber in großen Dosen hemmt, scheint auch bei der von O t t a w a y (10) beobachteten Steigerung der Glukoseaufnahme durch Rattenzwerchfell in vitro bei direktem Zusatz von STH in Dosen von 10 - 20 γ /ml Inkubationsflüssigkeit und bei der Hemmung durch Dosen von 50 - 100 γ /ml (11) vorzuliegen.

Tatsächlich kann mit völlig andersartigen chemischen Substanzen eine Steigerung der Glukoseaufnahme durch Zwerchfell in vitro und in vivo hervorgerufen werden. Da C h a r i u.a. (12) in einem Inkubationsmedium mit 50 mg % Glukose und 100 mg % Acetacetat oder durch vorherige Verabreichung von 10 mg Acetacetat je 100 g K.G. die Glukoseaufnahme steigern konnten, interpretierten B r ü g g e m a n n u.M. (13) den Insulineffekt in vitro als eine unspezifische Wirkung, zumal sie zeigen konnten, daß Arsentrionoxyd ebenfalls die Glukoseaufnahme durch Zwerchfell in niedriger Konzentration steigert und in hoher Konzentration hemmt. Außerdem kehrt sich auch die fördernde Wirkung des Insulins auf die Glukoseaufnahme bei höherem Insulinzusatz (30 γ /ml) in eine deutliche Hemmung um. Danach scheinen die in vitro Versuche mit isoliertem Rattenzwerchfell nicht den Aussagewert über die Insulinwirkung zu besitzen, den man ihnen früher zuschrieb.

Außerdem fanden B r ü g g e m a n n u.M. (13) nach Adrenalektomie eine höhere Glukoseaufnahme als nach Insulinapplikation. C o r i (1) hat dies damit erklärt, daß die Hexokinase durch NNR-Hormone gehemmt wird.

Wir wissen jedoch heute, daß für den Kohlehydratstoffwechsel der Muskulatur die Nebennierenrinde unentbehrlich ist. Man sollte deshalb annehmen, daß die NNR-Hormone die Hexokinase eher stimulieren.

In vielen neueren Arbeiten ist nun das Wesen der Insulinwirkung im Hinblick auf den Gesamtorganismus untersucht worden.

Insbesondere versuchte man zu entscheiden, ob die blutzuckersenkende Wirkung des Insulins vornehmlich auf eine Beeinflussung des Leberstoffwechsels oder auf eine Beschleunigung des Glukoseumsatzes an der Körperperipherie, speziell der Muskulatur, zurückzuführen sei.

Es ist erkannt worden, daß zwischen der Insulinverteilung und der Hexokinaseverteilung im Körper ein Widerspruch besteht. L o n g (14) findet die Hauptaktivität der Hexokinase in der Muskulatur und nur eine geringe in der Leber. Dagegen stellten E l g e e u.M. (15) in ihren Versuchen mit Insulin, das durch J^{131} markiert war, fest, daß der Hauptanteil des Insulins in die Leber und die Nieren wandert. Denselben Befund erhoben H a u - g a a r d u.a. (16) und K a l l e e u.M. (17). Ferner konnte L e e u.M. (18) nachweisen, daß die an Insulin gebundene Radioaktivität von der Leber aktiv aus dem Blut angereichert wird, während anorganisches J^{131} allein verabreicht in der Leber nicht vermehrt erscheint.

Diese Diskrepanz zwischen Insulinbedarf und Fermentaktivität scheint darauf hinzudeuten, daß das Insulin vor allem den Leberstoffwechsel beeinflußt.

In der Tat konnten B r ü g g e m a n n und Mitarb. (19) die Vorgänge Blutzuckersenkung und Steigerung der Glukoseaufnahme im Zwerchfell nach 10 E Insulin als zeitlich voneinander unabhängige Abläufe erkennen, während sich der Glukoseumsatz in der Leber parallel mit dem Blutzuckerspiegel änderte. Der Blutzucker und die freie Glukose in der Leber waren nach 15 Min. auf die Hälfte gesunken, während die Glukoseaufnahme im Zwerchfell erst nach 60 Min. gesteigert war.

Auch B o u c k a e r t u. d e D u v e (20) haben darauf hingewiesen, daß die Leber einen entscheidenden Einfluß auf die Insulinwirkung hat. Bei hepatektomierten Hunden benötigten sie nur 1/3 der Glukosedosis, die genommen wurde, um die Hypoglykaemie nach hohen Insulingaben bei Normaltieren zu verhindern. Nach ihrer Berechnung, in der sie die Gewichte der Leber und der Muskulatur zueinander in Beziehung setzten, müßte das Insulin auf die Leber etwa 8mal stärker einwirken als auf die Muskulatur.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Versuche von D u n n u.M. (21) mit C^{14} -Glukose praktisch dieselben Ergebnisse zeitigten. Als Maß für den Glukoseabfluß zur Peripherie diente ihnen die Radioaktivität des Blutes nach einem vorherigen intravenösen Stoß von C^{14} -Glukose. 30 Min. nach der

Glukoseinjektion erhielten die Hunde 10 E Insulin. Darauf fiel der Blutzuckerspiegel innerhalb von 20 Min. auf die Hälfte ab, obwohl die Radioaktivität des Blutes erst wesentlich später ansank und während der Zeit des Blutzuckersinkens unverändert blieb. Die Verfasser nehmen deshalb an, daß das Insulin in erster Linie die Glukosemobilisation in der Leber unterbindet.

In ähnlichen Versuchen kam W a l l (22) zu denselben Ergebnissen.

Da von vielen Autoren die Beobachtung gemacht wurde, daß zwischen dem Blutglutathionspiegel und dem Blutzuckerspiegel eine Abhängigkeit besteht, liegt die Vermutung nahe, daß dieses biologische Redoxsystem mit der Insulinwirkung eng verknüpft ist.

Es ist bekannt, daß Wachstumshormon (SH) (23), Acetacetat (24), Dehydroacetyl-hinsäure (25) und Alloxan (26) den Blutglutathiongehalt senken, während gleichzeitig der Blutzuckerspiegel erhöht wird. Eine längere Verabreichung von ACTH (27) und Cortison (28) führt zu denselben Veränderungen. Man könnte dies damit zu erklären versuchen, daß durch das verminderte SH-Glutathion-Angebot die für den Kohlehydratabbau notwendigen SH-Fermente ungenügend aktiviert und damit die Glukoseverwertung in der Körperperipherie verlangsamt wird.

Besonders bedeutungsvoll für die hier zur Diskussion stehenden Probleme ist der Befund von B i n k l e y u.M. (29), daß unter Insulinwirkung der SH-Glutathiongehalt der Leber abnimmt und damit parallel die ATP-ase-Aktivität sinkt, wie dies M a n n i (30) zeigen konnte. A s h m o r e u.a. (31) berichteten, daß sich die Phosphatase ebenso verhält.

Neue Möglichkeiten zur Klärung dieser Zusammenhänge eröffnen die Versuche mit eviscerierten Tieren. Den Insulineffekt, der auf Grund vieler Befunde (18, 19, 20) hauptsächlich die Leber zu betreffen scheint, konnte dabei beschränkt auf die Körperperipherie beobachtet werden.

W i n k u.M. (32) haben mit C¹⁴-Glukose festgestellt, daß Insulin am eviscerierten Kaninchen den Glukoseabfluß zur Peripherie erst nach einer gewissen Latenzzeit erhöht, wobei das Maximum nach 14 Std. erreicht wird. I n g l e u.M. (33) fanden an eviscerierten Ratten eine durchschnittliche Steigerung des Glukoseabflusses aus dem Blut, gemessen an der Menge Glukose, die nötig war, um den Blutzuckerspiegel gleich zu halten, von 17 mg/100 g Ratte auf 74 mg/100 g Ratte nach einer optimalen Dosis von 16 E Insulin/Std. Der Insulineffekt trat auch bei diesem Versuch erst nach längerer Wirkungsdauer in Erscheinung. In weiteren Untersuchungen an eviscerierten Hunden zeigten L a n g u.M. (34), daß unmittelbar nach 10 E Insulin /kg K.G. die Glukoseaufnahme

durch das extrahepatische Gewebe wesentlich geringer ist als beim Normaltier. Diese Glukoseaufnahme wurde dabei aus der arteriovenösen (A.-V.)-Glukosedifferenz berechnet. L a n g u.M. schließen aus diesen Befunden auf einen visceralen Faktor, der die Insulinwirkung überträgt.

S c h o l e u.M. (35) konnten nun wahrscheinlich machen, daß dieser viscera=le Faktor im SH-Glutathion zu suchen ist. Sowohl am Normaltier als auch am eviscerierten Tier konnten sie durch SH-Glutathion die A.-V.-Glukosedifferenz in den ersten 60 Min. erhöhen. Übereinstimmend mit L a n g (34) hatte Insulin diese Wirkung jedoch nur am Normaltier und trat bezeichnenderweise gegenüber der Glutathionwirkung um 20 Min. verzögert auf. Die Glutathionwirkung war dabei wesentlich abhängig von der NNR-Funktion, da bei gleichzeitiger Evisceration und Adrenalectomie die Glutathionwirkung nicht mehr so ausgeprägt war.

Das SH-Glutathion scheint demnach die Glukoseverwertung tatsächlich zu begünstigen. Mit dieser Beobachtung stehen die Ergebnisse von M a r t i n e z (36) in Einklang, daß nämlich nach Pankreatektomie der Glutathiongehalt in den peripheren Körnergeweben sinkt und daß unter Insulinwirkung das Glutathion aus der Leber verschwindet (29).

Unter diesen Gesichtspunkten liegt es nahe, die komplexe Stoffwechselstörung beim Diabetes letztlich einer Störung des Glutathiongleichgewichts zwischen Leber und Peripherie zuzuschreiben und die hormonale Funktion des Insulins in der physiologischen Regulierung dieses Gleichgewichtes zu sehen.

S c h o l e u.M. (35) sahen in Übereinstimmung mit den Befunden von W i c k u.M. (32) und I n g l e u.M. (33) eine direkte Einwirkung des Insulins auf die Glukoseaufnahme des Muskels, gemessen an der A.-V.-Blutzuckerdiffereenz beim eviscerierten Tier, erst nach einer längeren Wirkungsdauer, nämlich nach 80 Min. bei Dosen von 10 E/kg K.G. u. Std. Dabei wird eine ziemlich hohe Insulinkonzentration im Blut des eviscerierten Tieres erreicht, weil der Insulinabbau, der normalerweise durch die Leber und die Niere geschieht (37) unterbunden ist. Man könnte annehmen, daß das Insulin hier seine SH-Gruppen oxydierende Wirkung (9) direkt am Muskel entfaltet. Durch eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität, die auf diese Weise zustande gekommen ist, wäre der erhöhte Glukosedurchsatz erklärbar.

Bei diesem Insulineffekt auf die Muskulatur des eviscerierten Tieres, der erst nach langer Wirkungsdauer und hoher Dosierung auftritt, dürfte es sich im Prinzip um dieselbe Wirkung handeln, die das Insulin im normalen Organismus in der Leber hervorruft. Dieser Vorgang scheint in der Muskulatur unter

physiologischen Bedingungen nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben, da die Leber in diesem Fall den größten Teil des Insulins absorbiert (18, 19, 20).

Außerdem ist das Insulin selbst offensichtlich nicht für eine Steigerung der Glukoseverwertung durch die Muskelzellen notwendig, da *Ingley* (38) bei pankreatektomierten diabetischen Ratten durch künstlich erzwungene Muskelarbeit den Blutzuckerspiegel in ganz ähnlicher Weise senken konnte wie nach einem Insulinstoß. Die Muskelarbeit wurde dabei durch einen Nervenreizapparat, der rhythmische Kontraktionen an den Muskeln der beiden Hinterextremitäten hervorrief, vermittelt.

In diesem Zusammenhang sind einige Ergebnisse aus dem hiesigen Institut von besonderem Interesse. Nach Angaben von *Schole* (39) scheint eine große Reihe von synthesesfördernd (anabol) wirkenden Verbindungen, u.a. einige Antibiotika, fettlösliche Vitamine, Sexualhormone, auch anorganische Substanzen wie CuSO_4 usw. dadurch den Nährstoffansatz zu fördern, daß sie SH-Fermente durch Oxydation von Ferment-SH-Gruppen geringgradig hemmen. Als ein wichtiges Ergebnis dieser Versuche ist hervorzuheben, daß die oben genannten Substanzen diesen oxydierenden und damit inaktivierenden Effekt im wesentlichen nur in den Zellpartikeln (Mitochondrien und Mikrosomen) entfalten können. Anscheinend besteht eine Verknüpfung zwischen der Wirkungsentfaltung der genannten Verbindungen und den Fermenten der biologischen Oxydation, denn diese sind ausschließlich in den Zellpartikeln konzentriert. Es ist möglich, daß diese Substanzen unter bestimmten Bedingungen Redoxsysteme liefern können, nämlich dann, wenn ihnen ein System zur Verfügung steht, das zur Reoxydation (als Teil der Redox-Reaktion) in der Lage ist, wozu die Fermente der biologischen Oxydation anscheinend geeignet sind.

Auf diese Weise konnte man sich vorstellen, daß selbst das einfache Cupri-Ion, Cu^{++} , aus dem dissoziierten CuSO_4 im übertragenen Sinn zu einem Redoxsystem wird, indem es durch die Anlagerung an irgendein Fermentsystem der biologischen Oxydation zu einem ständigen Valenzwechsel befähigt wird. Seine biologische Aktivität bestünde demnach in der kontinuierlichen Übernahme eines Elektrons e^- aus dem Fermentsystem (gleichbedeutend mit Oxydation des Fermentsystems und Reduktion des Cupri-Ions, Cu^{++}) und Wiederabgabe eines Elektrons (gleichbedeutend mit Reduktion des Fermentsystems und Reoxydation des Cupro-Ions, Cu^+).



Durch die Einschaltung eines solchen reversiblen Systems scheint innerhalb bestimmter Grenzen eine Verschiebung in Richtung Oxydation des katabolen Fermentsystems und damit eine geringgradig verlangsamte Substratdissimilation zustande zu kommen. Da dieser Vorgang katalytischer Natur ist, wäre auch erklärlich, daß die obengenannten "anabol" wirkenden Substanzen schon in geringer Konzentration ihre Wirksamkeit zeigen.

Auch das Insulin scheint in vivo als ein solches Redoxsystem wirken und dadurch einen synthesefördernden Effekt hervorrufen zu können.

In der Tat wurde die anabole Wirkung oft bestätigt. A p p e l u. H a n s e n (40) berichteten, daß bei einschleichenden Dosen Insulin von 0,05/0,075/0,1 E beim Menschen zuerst der Blutfettspiegel, dann der Blutzuckerspiegel und schließlich die freien Aminosäuren im Blut absinken. G r i f f i n u.M. (41) fanden ebenfalls ein Absinken der freien Blutaminosäuren nach Insulin. Es scheint also, daß das Insulin tatsächlich den "Sog" zu den Fermenten der biologischen Oxydation in den Zellpartikeln herabsetzt und so im Gewebe die Bausteine für die Eiweiß- und Fettsynthese anreichert, d.h. vor weiterem Abbau bewahrt. L a w r e n c e u.M. (42) vermochten bei hypophysenlosen Ratten die N-Retention von 0 auf 40 % zu steigern, wenn sie Insulin verabreichten. M i l l m a n u.M. (43) hatten früher schon gefunden, daß STH nur zusammen mit Insulin verabreicht wachstumswirksam ist.

I n g l e u.a. (44) bestätigten den Befund von F r a m e u. R u s s e l (45), wonach der Blutaminosäuregehalt, der bei Ratten nach Evisceration von ca. 10 mg % auf 28 mg % anstieg, durch Insulinverabreichung normal gehalten werden konnte. Dabei bestand kein Zusammenhang mit dem Verhalten des Blutzuckerspiegels, so daß anzunehmen ist, daß das Insulin nicht indirekt über eine Transformation der Energie aus dem Zuckerstoffwechsel seine anabole Wirkung entfaltet.

Die synthesefördernde Wirkung des Insulins im Fettstoffwechsel zeigen die Versuche von B r a d y u. G u r i n (46), die in vitro in Leberschnitten den im Diabetes um 100 % gesteigerten Fettsäurenzerfall durch Insulinzusatz von 60 μ /ml Inkubationsflüssigkeit normalisieren konnten. Von O s b o r n (47) wurde dieses Ergebnis in vivo durch den ebenfalls nach Insulingaben normalisierten Einbau von C^{14} aus C^{14} -Pyruvat in Fettsäuren bestätigt.

In seinem synthesefördernden Effekt zeigt das Insulin jedoch eine besondere Affinität zum Leberstoffwechsel (18, 19, 20). Dies wird besonders am Bild

des Diabetes deutlich: die Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität ist dabei nach C o p e n h a v e r (48) in der Leber um 60 % und die G-6-P-ase um über 100 % gesteigert (31). L a u g d o n u.M. (49) finden in der Leber die G-6-P-ase-Aktivität nach Fasten und nach Cortisongaben in gleicher Weise gesteigert. Die G-6-P-ase ist nach ihren Angaben zu 65 % in den Zellpartikeln lokalisiert. Die gesteigerte G-6-P-ase-Aktivität in diabetischer Rattenleber konnten A s h m o r e u.M. (50) durch Insulingaben normalisieren. Nach diesen Befunden scheint tatsächlich die Hauptaufgabe des Insulins darin zu liegen, daß es die Fermentaktivitäten in der Leber in physiologischen Grenzen hält.

Zu dieser oft bestätigten anabolen Wirkung des Insulins scheinen auf den ersten Blick einige Berichte über "katabole" Effekte im Widerspruch zu stehen. A l l e g r e t t i (51) berichtet nämlich, daß die Thymusatrophie im "Stress" durch Pankreatektomie vermindert werden kann und nach Insulinsubstitution wieder auftritt, womit ein Synergismus zwischen Insulin und den katabol wirkenden NNR-Hormonen zu bestehen scheint (35). Im gleichen Lichte erscheint der Synergismus zwischen Ascorbinsäure und Insulin bei der blutzuckersenkenden Wirkung des Insulins, die A l l e g r e t t i u.M. (52) bei Meerschweinchen nach 100 mg Vitamin C i.p./Std. und 0,11 E Insulin beschleunigt und B a c c h u s u.a. (53) bei Vitamin C-Mangeltieren verzögert sahen.

Wenn man jedoch von der Vorstellung ausgeht, daß das Insulin, das beim Diabetes gestörte Glutathiongleichgewicht im Körper (s. S. 7) reguliert, so können die erwähnten "katabolen" Wirkungen durch das nach Insulingaben aus der Leber freigesetzte Glutathion erklärt werden (29).

In dieser Weise wäre der Synergismus zwischen Vitamin C und Insulin in Wirklichkeit als ein Synergismus zwischen Ascorbinsäure und Glutathion in ihrer aktivierenden Wirkung auf den Energiestoffwechsel aufzufassen.

Für die Möglichkeit einer solchen Verknüpfung zwischen Glutathion- und Vitamin C-Wirkung sprechen die Ergebnisse von F u n k (54), der eine maximale Grundumsatz-Steigerung bei 70 g schweren normalen Ratten nur durch Zuführung von Thyroxin, Cortison, Glutathion und Ascorbinsäure erzielte. Fehlte nur eine dieser Komponenten, so blieb der Effekt ganz aus oder war nur gering.

Nach der gebrachten Literaturzitate scheint die Gültigkeit des einleitend dargestellten Schemas (s. S. 2) unangefochten. Darin wurde die zentrale Stellung des G-6-P im Zuckerhaushalt hervorgehoben. Die in der Zeiteinheit gebildete G-6-P-Menge und damit der Glukosedurchsatz dürfte demnach als Resultante aus G-6-P-Bildung und -Zerfall, d.h. als Resultante aus Hexokinase- und

G-6-P-ase-Aktivität zu beurteilen sein. Es wäre denkbar, daß diese Resultate durch eine niedrige G-6-P-ase-Aktivität in Richtung Glukosedurchsatz verschoben und so eine erhöhte Hexokinase-Aktivität vorgetäuscht werden könnte.

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen G-6-P-ase-Aktivität und Glukoseaufnahme durch das Zwerchfell besteht. Außerdem wird der Einfluß des Insulins auf die Bernsteinsäuredehydrase- und ATP-ase-Aktivität untersucht. Weiterhin schien es aussichtsreich zu sein, das Augenmerk besonders darauf zu richten, welche Rolle dem SH-Glutathion bei der Wirkungsentfaltung des Insulins zukommt.

III. Methodik

a) Allgemeines

Alle im folgenden geschilderten Versuche wurden mit Ratten durchgeführt. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet, die alle aus der Zucht des Instituts für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München stammten.

Zu den einzelnen Versuchsgruppen wurden möglichst gleichaltrige und gleich schwere Tiere zusammengefaßt. Da jedoch für die einzelnen Versuchsreihen nicht immer genügend Tiere mit gleichem Körpergewicht zur Verfügung standen, wurden immer zwei einer Gewichtsklasse zu einem Versuchspaar zusammengestellt. Eines diente jeweils als Kontrolle, das andere als Versuchstier. Die Tiere wurden einheitlich mit Latz-Futter gefüttert und waren zu den Versuchen nicht ausgenüchtert.

Sämtliche ausgeführten Injektionen erfolgten subkutan.

Es wurden folgende Präparate injiziert:

- 1.) Insulin "Hoechst"
- 2.) Glutathion als SH-Glutathion (diese Substanz ist leicht wasserlöslich).

b) Bestimmung der Glukose-Aufnahme

Das Maß für die Glukoseaufnahme ist die aus einer bestimmten Menge (3 ml) Ringerlösung mit 500 mg % Glukose während einer bestimmten Inkubationszeit verschwundene Glukosemenge in mg.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurde das Zwerchfell schnell herauspräpariert und in kalter Ringerlösung von anhaftendem Blut gereinigt. Nachdem mit Filterpapier die Ringerlösung weitgehend abgesogen war, wurden das centrum tendineum und die Zwerchfellpfeiler wegpräpariert. Aus dem übrig bleibenden dünnen Muskelanteil wurden Zwerchfellstückchen von ungefähr 100 mg eingewogen. Diese wurden in Warburg-Kölbchen, die 3 ml Ringerlösung mit 500 mg % Glukose enthielten, über eine Zeit von 70 Min. inkubiert. Die Temperatur des Thermostaten betrug 37 Grad C, die Schüttelfrequenz 80 Schwingungen/Min.

Es wurde darauf geachtet, daß die verschiedenen Zusätze unmittelbar vor dem Einhängen der Kölbchen in den Thermostaten erfolgten.

Der O_2 -Verbrauch des Zwerchfells wurde nicht berücksichtigt, da in orientierenden Vorversuchen keine meßbaren Unterschiede auftraten.

Der gesamte Inhalt jedes Warburg-Gefäßes wurde quantitativ durch ein Papierfilter in ein 100 ml fassendes Meßkölbchen filtriert und mit viel aqua dest. nachgespült. Dann wurde das Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt.

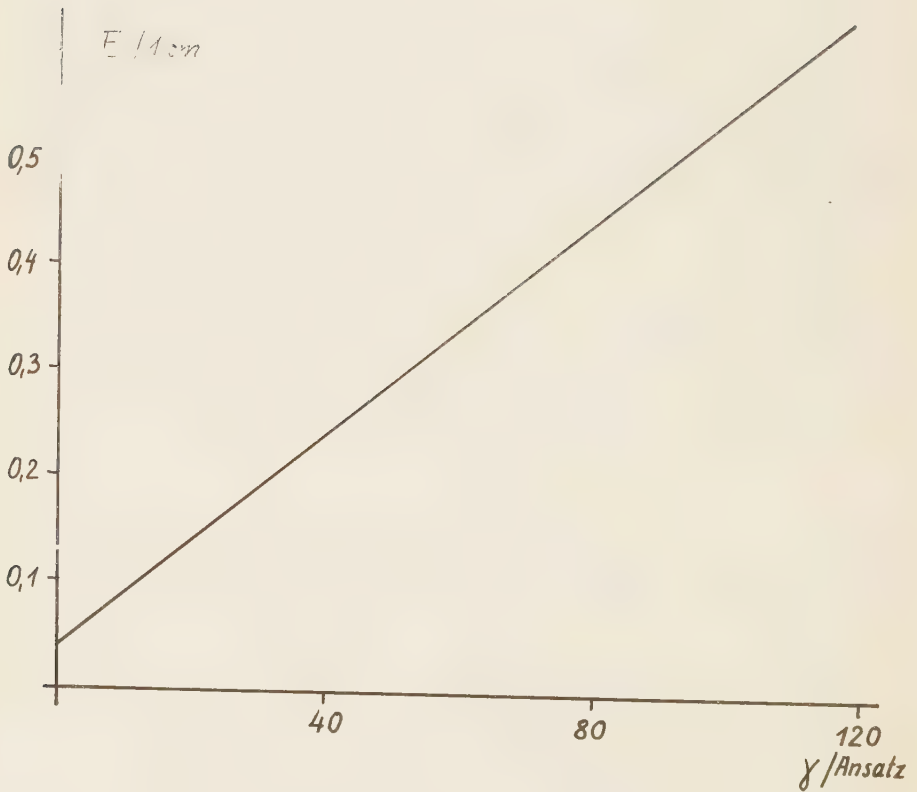
Bei jedem Versuch liefen zwei Blindwerte mit. In diesen Warburg-Kölbchen waren die gleichen Zusätze wie in den übrigen, nur war in diesen Gefäßen kein Zwerchfell enthalten.

Die Glukosebestimmung erfolgte mit Anthron (55). Dazu wurden 3 ml schwefelsaure Anthronlösung, die 0,1 g Anthron in 54 ml konz. H_2SO_4 enthielt, mit einem aliquoten Anteil der wässrigen Glukose-Ringerlösung vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden die Gläser gut durchgeschüttelt, genau 10 Min. in ein siedendes Wasserbad eingestellt und dann sofort auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Die entstandene Färbung ist dem Glukosegehalt direkt proportional und kann colorimetrisch im Eppendorf-Gerät ausgewertet werden. Das verwendete Filter war Hg 578 bei 1 cm Schichtdicke. Die Eichkurve ist aus Abb. 1 ersichtlich.

Die Anthronlösung ist gelb gefärbt, so daß ein Blindwert zu berücksichtigen ist, der die Eichkurve nicht durch den Nullpunkt laufen läßt.

Abb. 1



Glukose-Eichkurve

c) Die Blutzuckerbestimmung erfolgte ebenfalls nach dem Anthron-Verfahren. Das Blut wurde während des Ausblutens entnommen und enteiweißt. Dazu wurden 0,1 ml Blut quantitativ in eine Lösung von 5 ml 4,5 %igem $ZnSO_4$ und 1 ml n/10 NaOH pipettiert und 3 Min. gekocht. (Weiterverarbeitung s. S. 413).

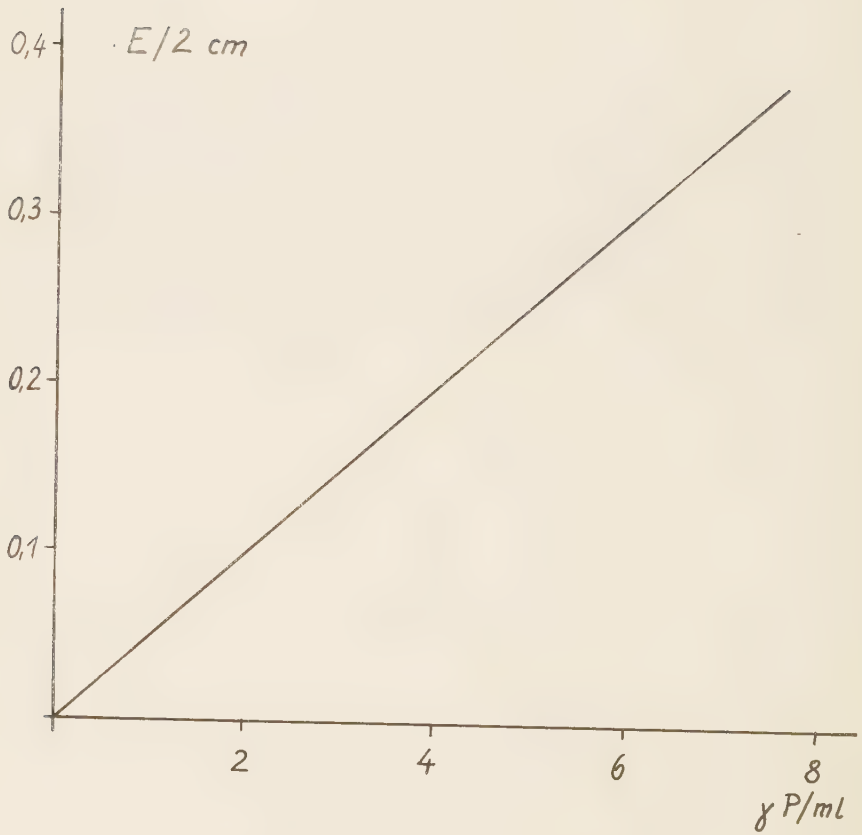
d) Glukose-6-Phosphatase-Aktivität

Als Maß für die Aktivität dieses Ferments dient das von G-6-P in der Zeiteinheit abgespaltene Phosphat.

Das anorganische Phosphat kann mittels Ammoniummolybdat und Phosphorwolframsäure quantitativ bestimmt werden. Aus Ammoniummolybdat und Phosphat entsteht ein Phosphorammoniummolybdänsäurekomplex, der in einem Gemisch von gleichen Teilen Isobutylalkohol und Benzol löslich ist. Der $P-NH_4$ -molybdänsäurekomplex wird durch $SnCl_2$ zu Molybdänblau reduziert. Die Intensität der Blaufärbung ist der Menge des vorhandenen Phosphats direkt proportional. Die Phosphatmenge kann deshalb colorimetrisch bestimmt werden. Die aus der vorher festgelegten Eichkurve entnommenen Werte sind dabei in μP ausgedrückt, d.h. sie sind auf das Gewicht des im Phosphat enthaltenen Phosphors bezogen.

Abb. 2 zeigt die Eichkurve.

Abb. 2



Phosphor-Eichkurve

Die Aktivität der G-6-P-ase wurde jeweils in der Leber und im Zwerchfell, d.h. in den aus diesen Organen hergestellten Homogenaten gemessen.

Herstellung der Fermentlösung:

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden Leber und Zwerchfell schnell herauspräpariert. Vom Zwerchfell wurden - unter Verwerfung der Zwerchfellpeiler und des sehnigen Teils - ca. 200 mg mit 7 ml und von der Leber ca. 200 mg mit 10 ml Tris-Pufferlösung, die 0,25 M Rohrzucker enthielt, fein zerrieben. Das Homogenat wurde dann zur Abtrennung grober Anteile 2 Min. bei 3000 Umdr./Min. zentrifugiert. Danach wurde die Fermentlösung dekantiert und bis zur Inkubation eiskühlt.

Durchführung der Bestimmung:

Nachdem so die verschiedenen Organextrakte von allen Tieren hergestellt waren, mußten die einzelnen Substanzen in der im folgenden geschilderten Weise zusammengebracht werden. Es wurde besonders darauf geachtet, daß Ferment und Substrat erst unmittelbar vor der Inkubation zusammengebracht wurden.

1.) Der Substratblindwert

Das in der Substratlösung, die 5 mg G-6-P in 1 ml Tris-Rohrzuckerlösung enthielt, vorhandene anorganische Phosphat wurde in der Zusammenstellung von 1,0 ml G-6-P-Lsg. und 2,0 ml Tris-Rohrzuckerlösung bestimmt.

2.) absoluter Blindwert

Es wurde festgestellt, daß in der Tris-Puffer-Rohrzuckerlösung ebenfalls Spuren von Phosphat vorhanden waren. Dieser Wert ist sowohl im Ferment-Substrat-Phosphatwert (3.) als auch im Ferment-Phosphatwert (4.) enthalten und wird dadurch bei der Subtraktion des letzteren bereits berücksichtigt. Damit dieser Wert nicht ein zweites Mal mit dem Substratblindwert (1.) vom Ferment-Substrat-Phosphatwert (3.) abgezogen wird, muß er vom Substratblindwert subtrahiert werden.

3.) Der Ferment-Substrat-Phosphatwert

In den für diesen Zweck vorbereiteten Reagenzgläsern wurden 2,0 ml Ferment-

*) Trishydroxymethylaminomethan + 0,1 N Salzsäure, eingestellt auf pH 7,0.

100 mg und 1 ml G-6-P-Lsg. 5 mg/ml unmittelbar vor der Inkubation zusammengebracht. Bei Anwendung dieser Fermentkonzentrationen sowohl aus Leber als auch aus Leberfell war die Abhängigkeit zwischen G-6-P-ase-Aktivität und Eiweißgehalt etwa linear.

4.) Der Fermentblindwert

Es wurde genau so wie unter 3.) verfahren. Nur wurde statt des 1 ml Substratlsg. 1 ml Trieb-Rohrzuckerlsg. in der Fermentlsg. zugesetzt.

Die Reagegläser mit den verschiedenen Ansätzen wurden 30 Min. in ein Wasserbad von 37,5 Grad C gestellt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 3 ml 10%iger Trichloressigsäure abgebrochen, der Inhalt der Gläser gut durchgeschüttelt und filtriert. 10-15 ml des klaren Filtrates wurden in der nachstehenden Reihenfolge

- 2 ml H₂O
- 5 ml Isobutanol-Benzol (1:1)
- 0,5 ml 10 n H₂SO₄
- 0,5 ml 10 %ige Ammoniummolybdatlsg.

zugesetzt. 10 Sek. kräftiges Schütteln. Hierte dazu, den gebildeten Phosphormolybdänmoleskomplex in die Isobutanol-Benzolmischg. überzuführen. Aus dieser oberen Schicht wurden 2 ml entnommen und mit einer Perchlorsäure-Alkoholgemisch (32 ml konz. H₂SO₄ gelöst in 968 ml absolutem Alkohol) versetzt und kräftig durchgeschüttelt. Beim Zusatz von 0,1 ml 10%ige 200fach verdünnte Lösung von 10 g molybd. (10 mg) in 25 ml konz. H₂SO₄ tritt die Blaufärbung auf, deren Intensität in einer 2 cm Kivette gegen 10%ige Ependick-Lsg. unter Verwendung des Filters Hg 578 gemessen wurde.

Da aus 1 ml der angesetzten 5 ml (1 ml G-6-P + 2 ml Fermentlsg. + 3 ml und bei nach der Inkubation weitere 3 ml in Form der Trichloressigsäure - zusammen also 5 ml) zur Phosphatbestimmung verwendet wurde, mußte der gefundene Phosphatwert bei der Berechnung mit 6 multipliziert werden, um die im Ansatz enthaltene Phosphatmenge zu erhalten. Vom Fermentsubstratwert (3.) mußte der Fermentblindwert (4.) und der durch Abzug des absoluten Blindwertes (2.) berechnigte Substratblindwert (1.) abgezogen werden. Der so gefundene Wert mußte dann nur noch auf 100 mg Eiweiß (siehe Eiweißbestimmung) umgerechnet werden.

e) ATP-ase-Aktivität

Bei der Bestimmung der ATP-ase-Aktivität wurde im Prinzip in gleicher Weise verfahren, wie bei der Bestimmung der G-6-P-ase-Aktivität.

Als Substrat diente dabei eine Lösung von 6 mg ATP/ml. Die Organextrakte wurden mit jeweils 100 mg Leber bzw. Zwerchfell und 10 ml Tris-Rohrzuckerlösung hergestellt.

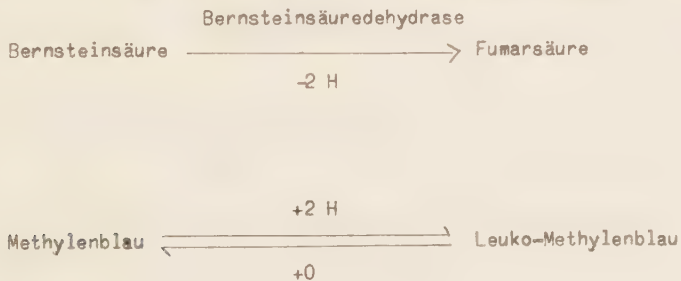
Um die Abhängigkeit zwischen ATP-ase-Aktivität und Eiweißgehalt im linearen Bereich zu halten, wurden nur 0,5 ml ATP-Lsg. als Substrat und 1 ml Organextrakt zusammen mit 1,5 ml Tris-Puffer-Rohrzuckerlösung inkubiert.

Dementsprechend wurden auch die ~~Blut~~ ^{Blut}werte angesetzt und die Umrechnung durchgeführt.

f) Bestimmung der Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität

1.) Prinzip:

Als Maß für die Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität dient der nach Dehydrierung der Bernsteinsäure auf Methylenblau übertragene Wasserstoff, dieses wird dabei zu Leuko-Methylenblau reduziert. Da die Leuko-Form durch Luftsauerstoff reoxydiert wird, kann die Dehydrase-Aktivität durch Messung des O_2 -Verbrauches nach Warburg bestimmt werden. Um spezifisch nur die Bernsteinsäuredehydrase zu erfassen, werden die Atmungsfermente durch KCN-Zusatz ausgeschaltet. Man erhält auf diese Weise folgendes System:



2.) Durchführung des Testes

Die Leber- bzw. Zwerchfellhomogenate wurden auf die gleiche Art und Weise hergestellt wie zur Messung der ATPase- und G-6-P-ase-Aktivität.

Als Puffer diente in diesem Falle eine Rohrzucker-Phosphat-Puffer-Lösung (0,25 m Rohrzucker in Phosphat-Puffer, pH 7, der aus 1 Teil $n/10 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ und 2 Teilen $n/10 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ bestand).

Aus ca. 210 mg Zwerchfell und ca. 350 mg Leber wurden die Organextrakte mit je 7 ml dieser Rohrzucker-Phosphat-Puffer-Lösung auf die oben geschilderte Weise hergestellt.

Als Substrat diente eine Lösung, die 15 mg Bernsteinsäure/ml R₀Z.-P-Pufferlsg. enthielt.

Nach Gewinnung der Fermentlösung wurden folgende Ansätze bereitet:

1.) zur Bestimmung des durch die Dehydrierung der Bernsteinsäure verbrauchten Sauerstoffs wurden folgende Substanzen in die zu diesem Zweck vorbereiteten kleinen Warburg-Kölbchen pipettiert:

0,4 ml Bernsteinsäurelösung
0,3 ml 0,01 m Methylenblaulösung
0,3 ml 0,1 m KCN-Lsg.
und 2,0 ml Fermentlösung.

Besonders wurde beachtet, daß Fermentlösung und Substratlösung erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zusammengebracht wurden.

2.) Zur Bestimmung des restlichen Sauerstoffverbrauchs der Fermentlösung allein wurde in gleichem Sinne verfahren wie unter 1.), nur wurde statt 0,4 ml Bernsteinsäurelösung 0,4 ml Rohrzucker-Phosphat-Puffer-Lsg. zugesetzt.

In den mittleren Einsatz der Warburg-Gefäße wurden jeweils 0,2 ml 30 %ige NaOH pipettiert, die mit einem Filterpapierföhnchen versehen wurde, um eine größere Oberfläche für die CO_2 -Bindung zu schaffen.

Nachdem die Kölbchen für die Bestimmungen vorbereitet waren, wurden sie mit den Manometern verbunden und in den auf 37 Grad eingestellten Thermostaten gehängt. Zum Temperatenausgleich wurden die Gefäße 10 Min. bei geöffnetem System geschüttelt.

Als Thermostat diente die Warburgapparatur Modell "S" von B. Braun, Melsungen, mit dem gleichzeitig 14 einzeln arretierbare Manometer in den Versuch ge-

nommen werden können. Die Schüttelfrequenz ist stufenlos regulierbar.

Der Thermostat des Gerätes bietet im günstigsten Falle eine Temperaturkonstanz von 0,005 Grad C, erfüllt also die Voraussetzungen für eine optimale Meßgenauigkeit.

Als Manometerflüssigkeit diente die "Brodie"-Lösung, deren spez. Gewicht bei 20 Grad C 1,034 beträgt. 10 mm Brodie-Lösung entsprechen also 760 mm Hg.

Die Schüttelfrequenz betrug 30 Schwingungen/Min. und die Amplitude 6 cm.

Nach dem Temperaturengleich wurde mit der manometrischen Messung der Druckänderung des Sauerstoffs begonnen; es wurden folgende Werte ermittelt:

- 1.) Zeit
- 2.) Abnahme des O_2 -Druckes im Substrat-Ferment-Kölbchen (P)
- 3.) Abnahme des O_2 -Druckes im Kölbchen mit dem Blindwert.

Mit Hilfe dieser drei Größen und dem bekannten Gefäßvolumen kann man den O_2 -Verbrauch in mm/mg Eiweißgehalt berechnen. Auf Normalbedingungen reduziert ergibt sich folgende Formel:

$$x_{O_2} = P_{(korr.)} \times K_{O_2}$$

In dieser Formel bedeutet x die verbrauchte O_2 -Menge, $P_{(korr.)}$ die um die Druckänderung im Blindwert-Manometer korrigierte Manometerablesung und K_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff, die durch folgende Formel bestimmt ist:

$$K_{O_2} = \frac{V_G \times 273/T + V_F \times \alpha}{P_{norm.}}$$

Dabei bedeutet:

- V_G das Volumen des Gasraumes
 V_F das Volumen der Flüssigkeit
 α den Bunsen'schen Absorptionskoeffizienten
 und $P_{(norm)}$ den Normaldruck ausgedrückt in mm Brodielösung
 (10000 mm = 760 Torr)

Der Bunsen'sche A.-koeffizient wurde vernachlässigt, da in den verwendeten Flüssigkeiten die gelöste O_2 -Menge minimal ist.

Der mit Hilfe dieser Formeln berechnete O_2 -Wert wurde dann auf 100 mg Eiweiß

umgerechnet.

g) Eiweißbestimmung

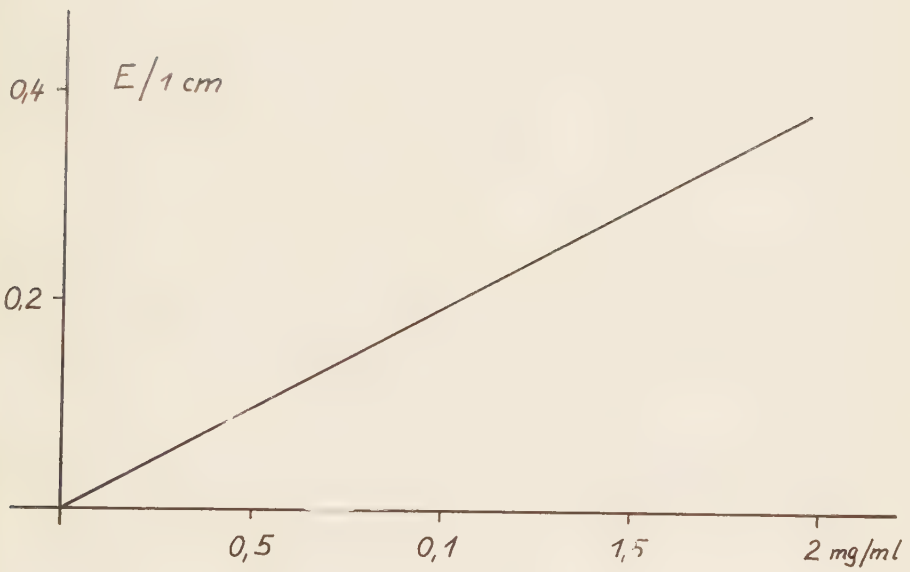
Die gefundenen Werte, die als Maß für die Fermentaktivitäten dienen, also das anorganische Phosphat und der Sauerstoffverbrauch, konnten nicht auf bestimmte Organgewichte bezogen werden, da der Wassergehalt derselben starken Schwankungen unterworfen ist.

Als Bezugsgröße diente daher in jedem Falle der Eiweißgehalt der Fermentlösungen. Sämtliche Werte wurden auf 100 mg Eiweiß umgerechnet.

Zur Eiweißbestimmung diente der Trübungstest.

Dabei wurde die Trübung gemessen, die durch 2,5 ml einer 5 %igen Trichlor-essigsäure bei 1,0 ml Fermentlösung nach 5 Min. hervorgerufen wurde. Gleichzeitig wurde die Eigentrübung der Fermentlösung gemessen und vom Trichlor-essigsäurewert abgezogen. Die Eiweißwerte konnten dann einer Eichkurve entnommen werden. Gemessen wurde in einer 1 cm Küvette gegen H_2O mit Filter 578.
Die Eichkurve ist in Abb. 3 dargestellt.

Abb. 3



Eiweiß-Eichkurve

IV. Ergebnisse

Die Bestimmung der Fermentaktivitäten wurde bei den einzelnen Tieren immer gleichzeitig im Leber- bzw. Zwerchfell-Homogenat vorgenommen. Wegen der besseren Übersicht wurden Leber- und Zwerchfell-Werte in verschiedenen Tabellen aufgeführt.

Da die Ergebnisse im Paarvergleich ausgewertet wurden (s. Methodik), mußte auf die Klare der vier Mittelwerte aus den ganzen Versuchsgruppen in den Tabellen verzichtet werden. Bei den angegebenen Werten handelt es sich vielmehr um Tages-Mittelwerte, die bei je 4 möglichst gleichmäßigen Tieren, nämlich 2 Kontrollen und 2 Versuchstieren, auftraten. Dagegen ist die jeweils angegebene prozentuale Änderung aus allen Ergebnissen einer Versuchsgruppe errechnet.

Die statistische Auswertung (Errechnung der P-Werte) erfolgte nach L i n d e r (56). Dabei wurden die P-Werte aus allen Ergebnissen einer Versuchsreihe gewonnen.

A. Normalwerte

Bei jedem Versuch gleichzeitig die Kontrollwerte ermittelt werden mußten, um eine genügend große Zahl von Normalwerten zur Verfügung, deren Mittelwert jeweils für Tiere etwa gleichen Alters und gleicher Gewichtsklasse bestimmt wurde. Diese bei Normaltieren bestimmten Werte sind in Tab. I zusammengefaßt.

Dabei tritt deutlich der Zusammenhang des regeren Stoffwechsels der kleineren Tiere mit den höheren Fermentaktivitäten und der stärkeren Glukoseaufnahme zutage.

Zusammenfassung der Normalwerte der Fermentaktivitäten und der Glukose-Aufnahme
bei Tieren verschiedener Gewichtsklassen

G-6-P-ase		Pyruvat-Dehydrogenase		ATP-ase		Glukose-Aufnahme	
g K.G.		mm O ₂ /100 mg Eiweiß/30'		g P/100 mg Eiweiß/30'		mg Glukose/100 mg Zwerchf./70'	
Zwerchf.	Leber	g K.G.	Zwerchf.	Leber	g K.G.	Zwerchf.	Zwerchfell
110-	149	300	1588	401	100-	8850	2,07
120	+3,7	+28,8	130	+38,8	120	*	+0,03
185-	76	263	1134	371	215-	6569	1,58
210	+7,4	+18,7	160	+40,5	250	+592	+0,07

* nur 4 Tiere

B. G-6-P-ase-Aktivität und Glukose-Aufnahme des Zwerchfells unter Insulinwirkung, d.h. 1 und 3 1/2 Stunden nach Verabreichung von 10 E s. c.

In dieser ersten Versuchsreihe sollte ermittelt werden, ob zwischen der Insulinwirkung auf die G-6-P-ase und der Wirkung desselben auf die Glukose-Aufnahme des Zwerchfellmuskels eine zeitliche Beziehung besteht.

In einer ersten Gruppe von 8 Versuchspaaren wurde die G-6-P-ase-Aktivität 1 Std. nach Insulinverabreichung, in einer zweiten Gruppe von 6 Versuchspaaren jene nach 3 1/2 Std. gemessen. Zu Versuchsbeginn erhielt das "Insulintier" 10 E Insulin subkutan, die Kontrolle 0,25 ml physiol. NaCl-Lsg. s. c.

In orientierenden Vorversuchen wurde getestet, wieviel Glukose s.c. verabreicht werden mußte, um bei der obengenannten zweiten Gruppe, die 3 1/2 Std. unter Insulineinwirkung stand, den Blutzuckerspiegel etwa in physiologischen Grenzen zu halten. Eine stündliche Glukosegabe von 250 mg (0,5 ml 50 %ige Glukoselösung) zeigte sich bei 120 g schweren Ratten als genügend, um den Blutzuckerspiegel bei ca. 115 mg % (118 mg %, 105 mg %, 132 mg %, 108 mg %) zu halten. Der G-6-P-ase steigernde Effekt des Insulins nach 3 1/2 Std. war jedoch unabhängig von dieser Glukosezufuhr bei Tieren, die keine Glukose erhielten, prozentual gleich ausgeprägt.

Da für die Bestimmung der G-6-P-ase-Aktivität fast der gesamte brauchbare Teil eines Zwerchfells für das Homogenat benötigt wurde, konnte die Glukoseaufnahme nicht an denselben Tieren gemessen werden.

Daher diente eine weitere Gruppe von 8 Versuchspaaren zur Bestimmung der Glukoseaufnahme 1 Std. nach 10 E Insulin und eine solche von 6 Versuchspaaren 3 1/2 Std. nach 10 E Insulin. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt und in Abb. 4 und 5 dargestellt.

Aus den angeführten Werten ist zu ersehen, daß eine direkte zeitliche Korrelation zwischen G-6-P-ase-Aktivität und Glukoseaufnahme im Zwerchfell unter Insulinwirkung besteht, und zwar in der Weise, daß die Hemmung der Phosphatase mit Steigerung der Glukoseaufnahme (nach 1 Std.) und eine Stimulierung der G-6-P-ase mit einem Absinken der Glukoseaufnahme parallel verläuft.

Zeit nach Insulin- verabr.	G-6-P-ase-Aktivität im Zwerchfell P/100 mg Eiweiß/30 Min.		Glukose-Aufnahme mg Glukose/100 mg Zwerchfell/70 Min.	
	Kontrolle	10 E Insulin	Kontrolle	10 E Insulin
1 Std.	105*	65*	1,7	2,1
		proz. Änd. -42,1 %* P = < 0,01		proz. Änd. +32,6 % P = < 0,05
3 1/2 Std.	100	183	1,7	1,5
		proz. Änd. +76,0 % P = < 0,05		proz. Änd. -18,1 % P = < 0,05

Insulinwirkung auf G-6-P-ase-Aktivität und Glukose-Aufnahme

* Es sind hier wie in allen folgenden Tabellen Tagesmittelwerte angegeben (s. Methodik Abschnitt A)

Die proz. Änd. und die P-Werte sind aus sämtlichen Ergebnissen errechnet

mg-Glukose

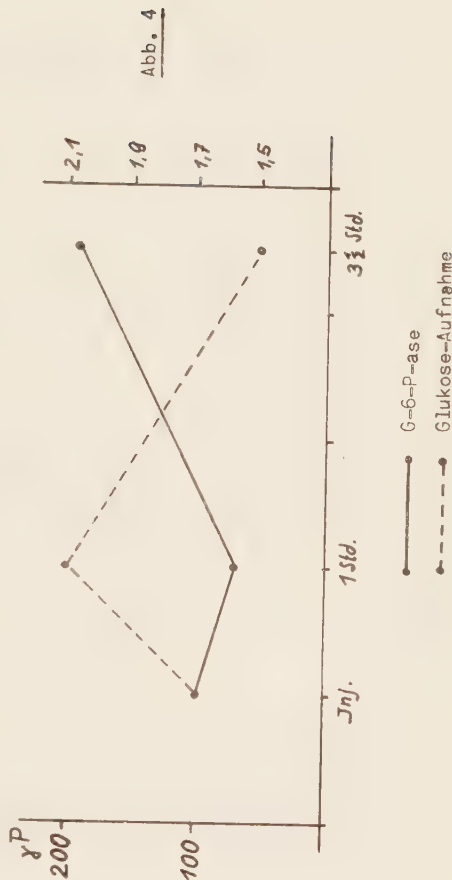
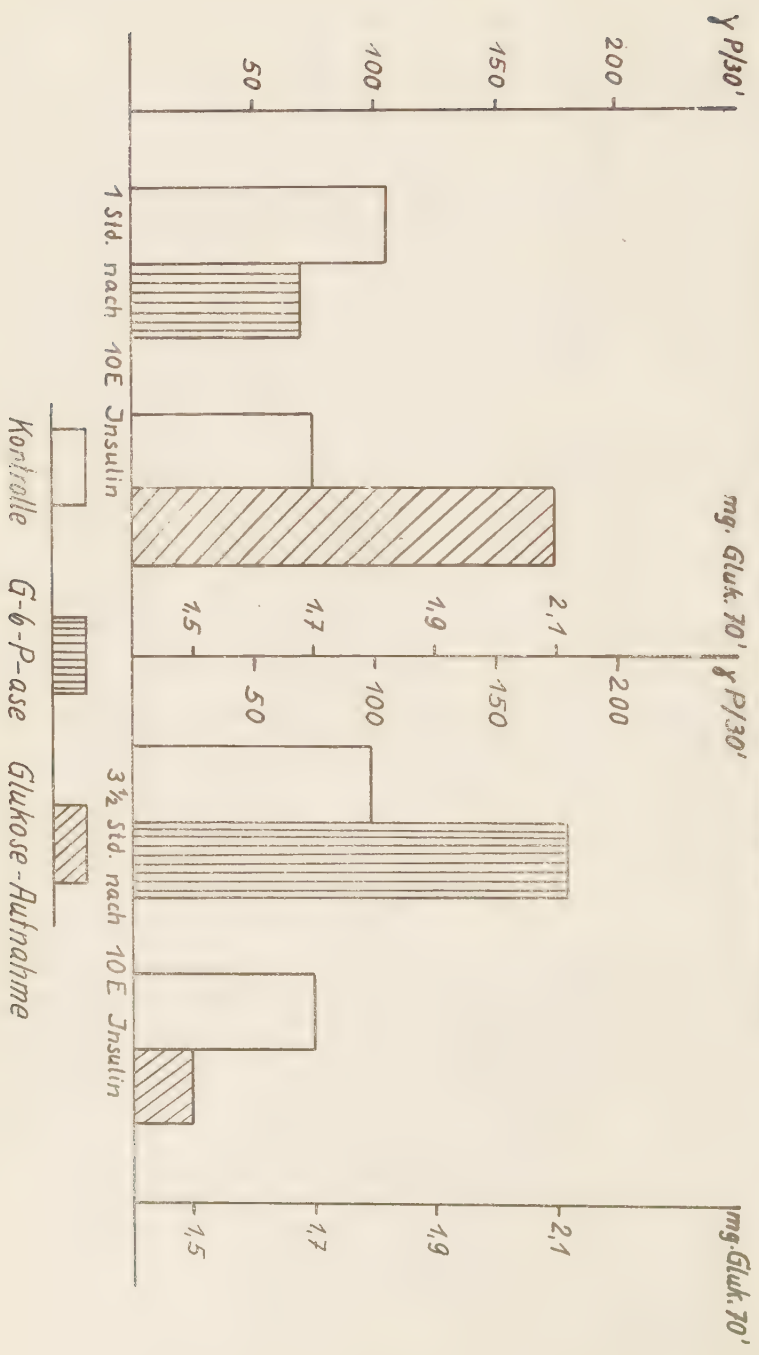


Abb. 5

Insulinwirkung auf G-6-P-ase-Aktivität und Glukoseaufnahme im Zwerchfell



C. G-6-P-ase-Aktivität und Glukose-Aufnahme im Zwerchfellmuskel 20 Min. nach 1 mg - 30 Min. nach 3 mg - u. 90 Min. nach 16 mg SH-Glutathion s. c.

In Anlehnung an die im Literaturteil besprochenen Ergebnisse von S c h o - l e u.M. (34) sollte in der folgenden Versuchsreihe untersucht werden, ob durch SH-Glutathion ähnliche Effekte im Zwerchfell zu erzielen sind wie durch Insulin und wie dabei die Beziehung zwischen Phosphatase-Aktivität und Glukose-Aufnahme beeinflußt wird.

In einer ersten Versuchsgruppe, die aus 8 Paaren bestand, wurde der Effekt von 1 mg SH-Glutathion mit einer Wirkungsdauer von 20 Min. auf die G-6-P-ase bestimmt. Dabei schien eher eine leichte Tendenz zur Hemmung vorzuliegen.

Die zweite und dritte Versuchsgruppe bestanden aus je 4 Versuchspaaren und dienten der Messung der G-6-P-ase unter Einwirkung von 3 mg SH-Glutathion in 30 Min. und von 16 mg SH-Gl. in 90 Min.

Bei weiteren drei Gruppen wurde mit Hilfe von 4 Paaren die Glukose-Aufnahme nach 1 mg SH-Gl./20 Min., mit Hilfe von 2 Paaren nach 3 mg SH-Gl./30 Min. und mit 4 Versuchspaaren nach 16 mg SH-Gl./90 Min. bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. 3 zusammengestellt und außerdem aus Abb. 6 und 7 ersichtlich.

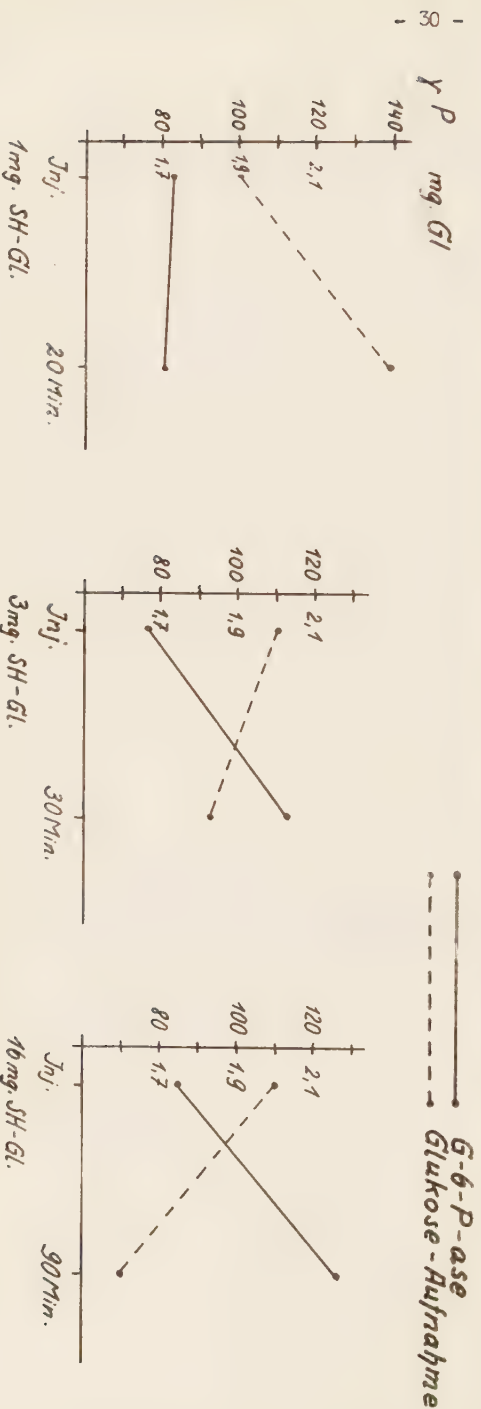
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Steigerung der Glukose-Aufnahme nach 1 mg SH-Gl./20 Min. als Parallel-Ergebnis gelten kann zu dem Befund von S c h o l e u.M. (34): Ansteigen der A.v.-Differenz nach i.v. Glutathion.

Interessant ist, daß nur mit der geringen Dosis von 1 mg SH-Gl. bei der kurzen Wirkungsdauer von 20 Min. die Glukose-Aufnahme beschleunigt werden kann. Im Unterschied zum Insulin bleibt der Effekt auf die G-6-P-ase aus.

Bei höherer Dosierung und längerer Wirkungsdauer bewirkt das SH-Glutathion in dem Maße eine Hemmung der Glukose-Aufnahme, in dem es die G-6-P-ase stimuliert.

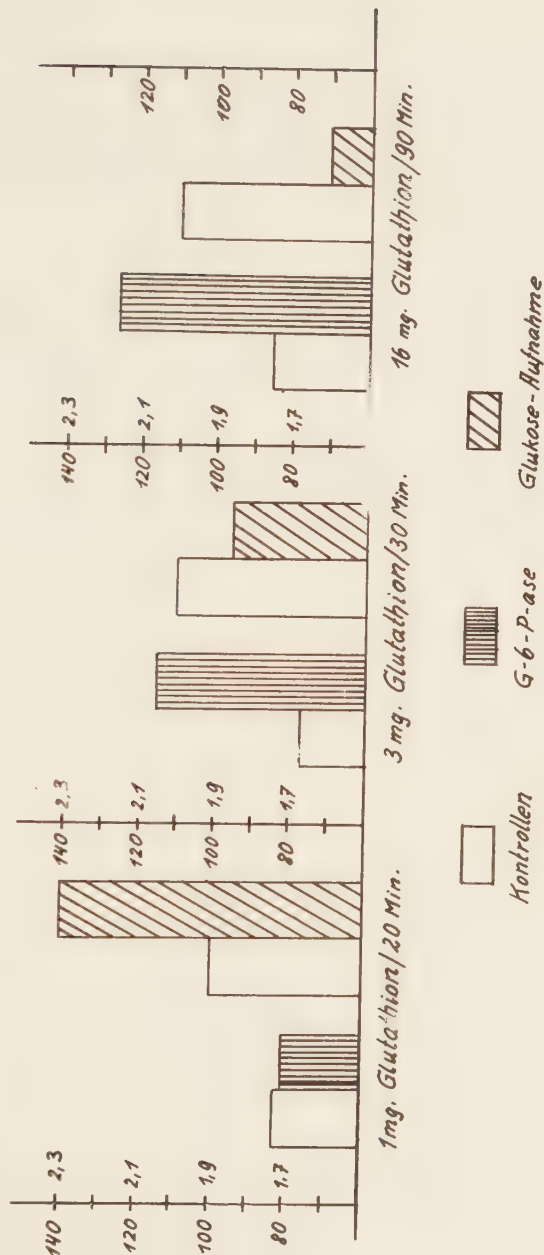
Zeit bis Zielfotung	Glutathion Dosis	G-6-P-ase-Aktivität in μ P/100 mg Eiweiß/30 Min.		Glukose-Aufnahme in mg Glukose/100 mg Zwerchf./70 Min.	
		Kontrolle	Glutathiontier proz. Änd.	Kontrolle	Glutathiontier proz. Änd.
20 Min.	1 mg	83	81 (nicht gesich.)	1,9	2,3 + 35,1 % $P = < 0,01$
30 Min.	3 mg	77	114 + 53,0 % $P = < 0,05$	2,0	1,85 (2 Versuche) - 8,5 %
30 Min.	16 mg	85	126 + 80,4 % $P = < 0,05$	2,0	1,6 - 23,8 % $P = < 0,05$

Abb. 6: SH-Glutathion-Wirkung auf G-6-P-ase-Aktivität und Glukose-Aufnahme im Zwerchfell



SH-Glutathion-Wirkung auf G-6-P-ase und Glukose-Aufnahme durch Zwerchfell

γ P mg. Glukose



D. G-6-P-ase in Leber unter Insulin- bzw. Glutathion-Wirkung

Bei denselben Versuchsgruppen, bei denen in den vorhergehenden Versuchen die G-6-P-ase-Aktivität unter Insulin- bzw. Glutathion-Wirkung im Zwerchfell bestimmt wurde, ist gleichzeitig die G-6-P-ase-Aktivität der Leber ermittelt worden.

Die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt.

Anscheinend ist die Leber G-6-P-ase durch den Insulinstoß von 10 E/Std. bzw. 10 E/3 1/2 Std. viel weniger beeinflussbar als die Muskel-G-6-P-ase. Die beobachteten Unterschiede liegen innerhalb der Schwankungsbreite und sind daher nicht als Differenz zu werten.

Dagegen bewirkt 1 mg SH-Glutathion schon nach 20 Min. eine gut gesicherte Steigerung der Leber-G-6-P-ase um 30 %. Parallel zu dieser Steigerung der Leber-G-6-P-ase verläuft eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels um 46 % (Tab. 5, Abb. 8).

Tab. 4: Leber-G-6-P-ase-Aktivität in μ P/100 mg Eiweiß/30 Min.

Zeit bis Zerlösung	Kontrolle	10 E Insulin	proz. Änd.	Zeit bis Zerlösung	SH-Gluta- thion-Dosis	Kontrolle	Glutathiontier	proz. Änd.
1 Std.	297	304	+0 %	20 Min.	1 mg	470	608	+30 % P = <0,05
3 1/2 Std.	290	300	+0 %	30 Min.	3 mg	429	415	+0 %

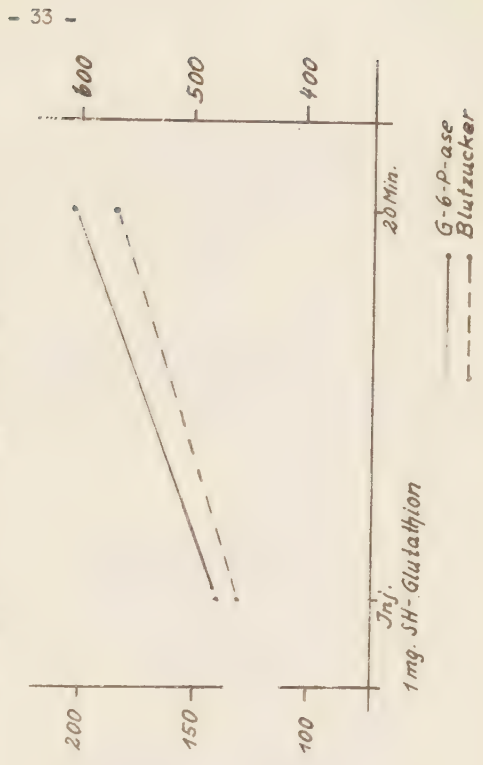
Abb. 8: SH-Glutathion-Wirkung auf Leber-G-6-P-ase u. Blutzucker

Blutzucker mg. % μ P/100 mg. Eiweiß

Tab. 5

Blutzuckerspiegel in mg % Glukose	
Kontrolle	Glutathiontier* prz. Änd.
125 mg %	188 mg % + 46 % P = <0,01

* 20 Min. vor Tötung 1 mg SH-Glutathion s.c.



E. Die Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität in Zwerchfell nach 10 E Insulin s. c. bei einer Wirkungszeit von 1 Std. bzw. 3 1/2 Std. und nach einmaliger Dosis von 1 mg Glutathion mit 20 Min., von 3 mg Gl. mit 90 Min. und von 16 mg mit ebenfalls 90 Min. Wirkungszeit.

Nachdem in den seitherigen Versuchen einige Zusammenhänge zwischen der Wirkung des SH-Glutathions und des Insulins auf die G-6-P-ase und die Glukose-Aufnahme im Zwerchfell und der G-6-P-ase der Leber festgestellt werden konnten, soll in dem folgenden Abschnitt geprüft werden, ob solche Zusammenhänge auch zwischen Insulin- bzw. Glutathion-Einfluß auf die Bernsteinsäuredehydrase, einem Ferment des C₄-Trikarbonsäurezyklus, bestehen.

An je 7 Versuchspaaren wurde nach Insulin innerhalb 1 Std. eine sehr gut gesicherte Hemmung um 21,7 % und nach 3 1/2 Std. eine Steigerung der Zwerchfell-Bernsteinsäuredehydrase festgestellt.

Das Glutathion bewirkte dagegen eine Stimulierung der Zwerchfell-Bernsteinsäuredehydrase schon bei der minimalen Dosis von 1 mg SH-Gl./20 Min. (7 Versuchspaare). Durch 16 mg/90 Min. war dieser Effekt noch ausgeprägter (5 Versuchspaare). Die Zwerchfell-Bernsteinsäuredehydrase reagiert anscheinend sehr empfindlich auf SH-Gruppen.

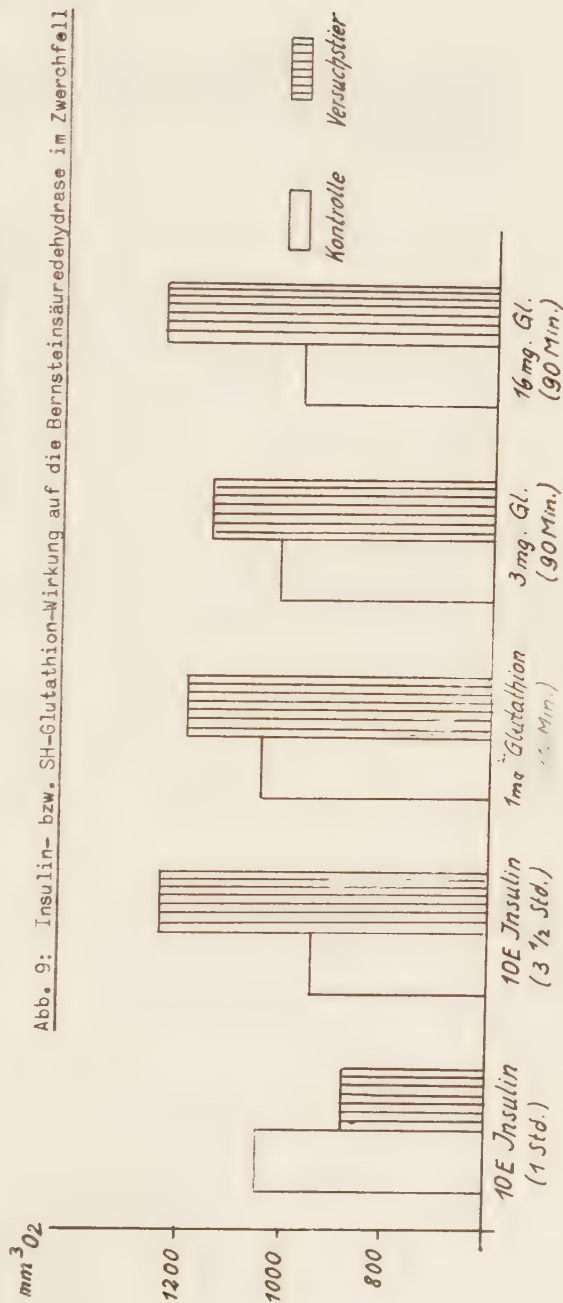
Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt und aus Abb. 9 ersichtlich.

Tab. 6: Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität in Zwerchfell ($\text{mm}^3/100 \text{ mg Eiweiß}/60 \text{ Min.}$)

Zeit bis Tötung	Kontrolle	10 E Insulin	Proz. Änd.	Zeit n. Gl.verabr.	Kontrolle	Glutathion- tier	proz. Änd.
1 Std.	1050	865	-21,7 % $P = < 0,01$	20' / 1 mg*	1065	1215	+16,5 % $P = < 0,05$
3 1/2 Std.	950	1260	+38,4 % $P = < 0,05$	90' / 3 mg*	1030	1160	+12,5 % (2 Versuche)
				90' / 16 mg*	980	1230	+24,8 % $P = < 0,05$

* SH-Glutathiondosis

Abb. 9: Insulin- bzw. SH-Glutathion-Wirkung auf die Bernsteinsäuredehydrase im Zwerchfell



F. Die Bernsteinsäuredehydrogenase in Leber nach 10 E Insulin/1 Std. und nach 10 E Insulin/3 1/2 Std. bzw. nach 1 mg SH-Glutathion/20 Min., nach 3 mg/90 Min. und nach 16 mg/90 Min.

Es handelt sich hier um die gleichen Versuchsgruppen wie im vorigen Abschnitt.

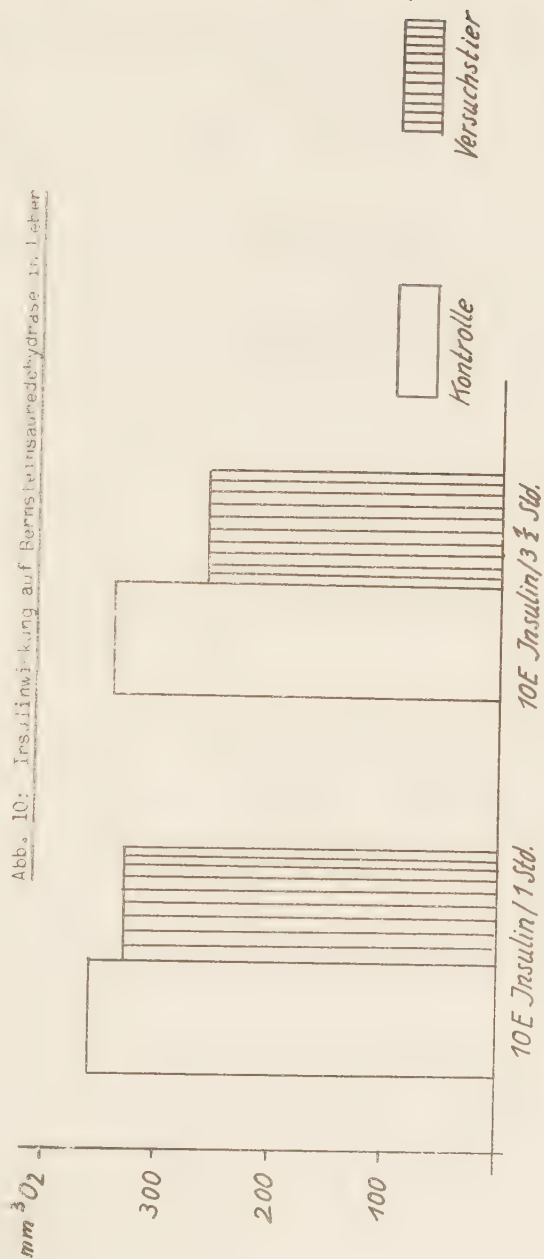
Die Werte sind in Tab. 7 aufgeführt und in Abb. 10 dargestellt.

Nach einer Stunde ist bereits ein hemmender Effekt durch Insulin vorhanden, der jedoch noch nicht gesichert ist; deutlich und gut gesichert wird er nach 3 1/2 Std. Die Glutathionwirkung ist dagegen nicht ausgeprägt.

Tab. 7: Bernsteinsäuredehydrogenase-Aktivität in der Leber (in $\text{mm}^3 \text{O}_2 / 100 \text{ mg Eiweiß} / 60 \text{ Min.}$)

Zeit bis Tötung	Kontrolle	10 E Insulin	proz. Änd.	Dosis	Glutathion Zeit*	Kontrolle	Glutathion Zeit*	proz. Änd.
1 Std.	365	330	-8,5 % (nicht ges.)	1 mg	20 Min.	500	535	+2,4 % (nicht gesichert)
3 1/2 Std.	340	258	-24,4 % $P < 0,05$	3 mg	90 Min.	480	480	+0 %
				16 mg	90 Min.	506	532	+10,6 % (nicht gesichert)

* Zeit bis Tötung



G. ATP-ase-Aktivität der Leber nach 10 E Insulin 1 bzw. 3 1/2 Std. und nach
3 mg SH-Glutathion/90 Min.

Um einen weiteren Überblick über den Einfluß des Insulins auf die Fermentaktivitäten vor allem in der Leber zu erhalten, wurde abschließend die Insulinwirkung auf die ATP-ase getestet.

Bei einer Versuchsgruppe von 4 Versuchspaaren zeigte sich bereits 1 Std. nach einem Insulinstoß von 10 E eine gut gesicherte Hemmung der ATP-ase, die auch nach 3 1/2 Std. ausgeprägt war (Tab. 8, Abb. 11).

Eine SH-Glutathion-Wirkung auf die Leber-ATP-ase war nicht nachweisbar, diese war ja auch bei der Leber-Bernsteinsäuredehydrase nur angedeutet.

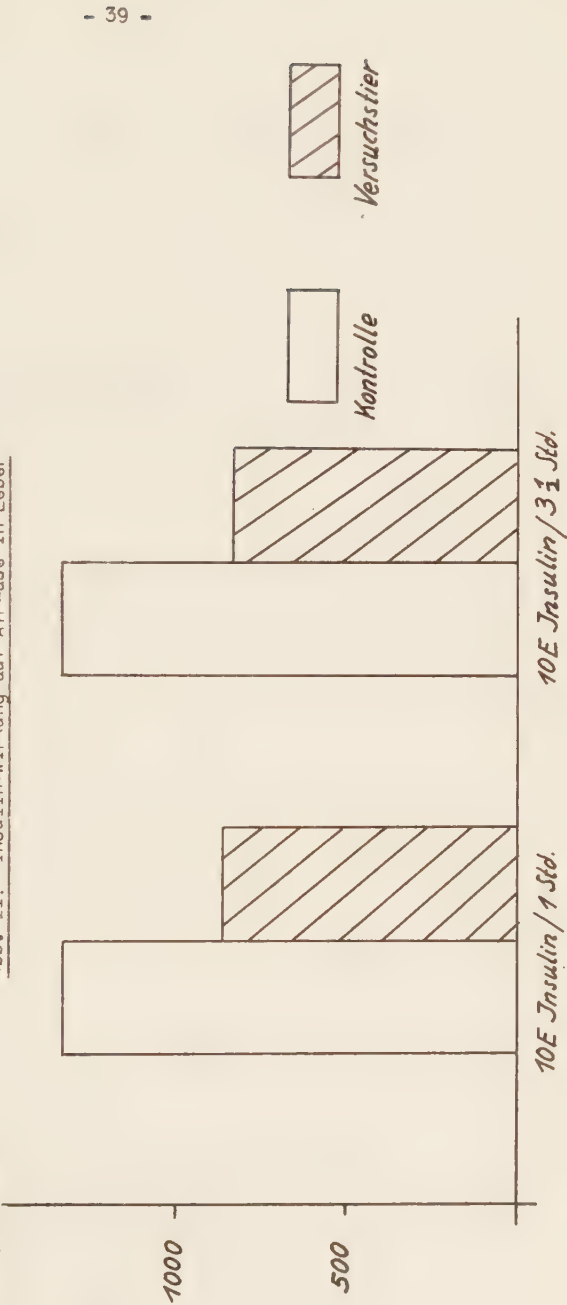
Tab. 8: ATP-ase-Aktivität in Leber (μ P/100 mg Eiweiß/30 Min.)

Zeit bis Tötung	Kontrolle	10 E Insulin	proz. Änd.	Glutathion Dosis	Kontrolle	Glutathionier	proz. Änd.
1 Std.	1340	911	-31,7 % $P < 0,05$	3 mg/90'	1330	1320	+0 %
3 1/2 Std.	1320	855	-35 % *				

* nicht gesichert, da nur eine Versuchsgruppe von 4 Tieren.

μ P/100mg. Eiweiß

Abb. 11: Insulin-Wirkung auf ATP-ase in Leber



H. ATP-ase in Zwerchfell 1 Std. und 3 1/2 Std. nach 10 E. Insulin und 90 Min.
nach 3 mg SH-Glutathion

Diese Werte wurden bei denselben Versuchsgruppen gefunden wie im vorigen Abschnitt und sind in Tab. 9 und Abb. 12 zusammengefaßt.

1 Std. nach Insulin ist die ATP-ase deutlich gehemmt - vergleichbar mit der G-6-P-ase-Hemmung (s. Abschnitt B).

3 1/2 Std. nach Insulin ist die ATP-ase undeutlich gesteigert. Es wurden allerdings hier nur orientierende Messungen durchgeführt, da ja die Bernsteinsäuredehydrase als Modell eines Mitochondrienfermentes gelten kann.

Nach SH-Glutathion (3 mg/90 Min.) ist die ATP-ase-Aktivierung sehr deutlich.

Tab. 9. ATP-ase-Aktivität in Zwerchfell (μ P/100 mg Eiweiß/30 Min.)

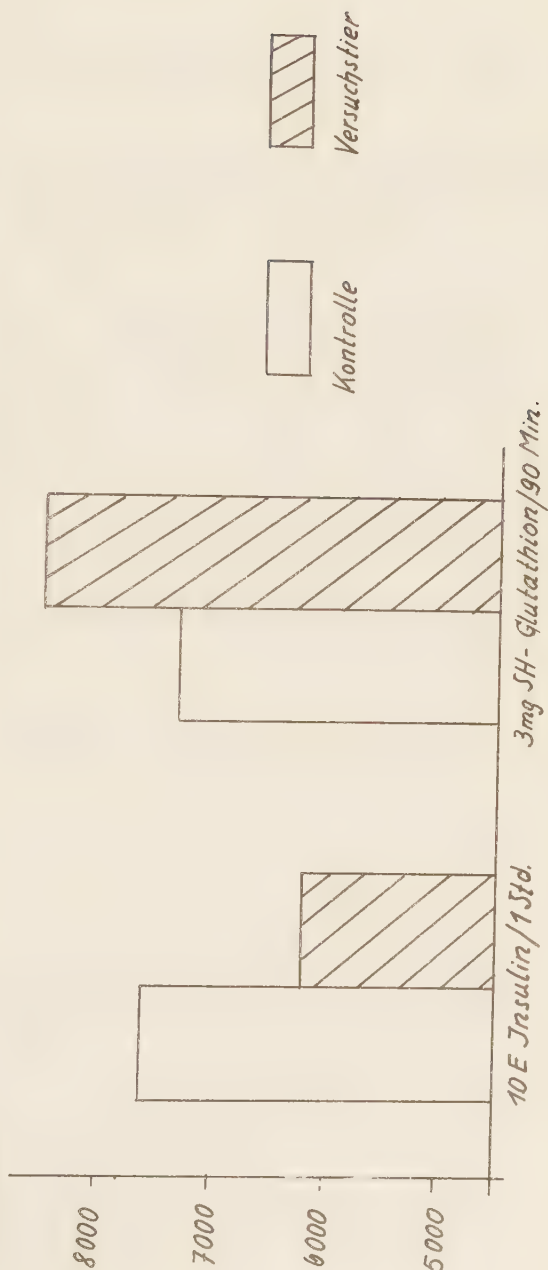
Zeit bis Tötung	Kontrolle	10 E Insulin	proz. Änd.	Glutathion Dosis	Kontrolle	Glutathiontier	proz. Änd.
1 Std.	7670	6360	-20 % **	3 mg/ 90 Min.*	7380	8550	+17,5 % P = <0,01
3 1/2 Std.	5467	5900	+8 % **				

* Zeit bis Tötung

** Testversuche

Abb. 12: Insulin- bzw. Glutathionwirkung auf die ATP-ase in Zwerchfell

μ P/30 Min.



V. Diskussion

Aus den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche geht hervor, daß im Zwerchfellmuskel eine zeitliche Beziehung zwischen der Änderung der Phosphatase-Aktivität und der Änderung der Glukose-Aufnahme nach Insulin-einwirkung vorhanden ist.

Diese zeitliche Beziehung besteht jedoch bei einer Dosis von 1 mg SH-Glutathion innerhalb 20 Min. nicht, während sie bei einer Dosis von 16 mg und 90 Min. Wirkungsdauer wieder deutlich ausgeprägt ist. Daraus geht hervor, daß die Steigerung der Glukose-Aufnahme, die 1 Std. nach 10 E Insulin und 20 Min. nach Glutathion eintritt, nicht auf die gleiche Art und Weise erreicht wird.

Dagegen kommt die Wirkung von 10 E Insulin nach 3 1/2 Std. und die Wirkung von 16 mg SH-Glutathion nach 90 Min. offenbar über den gleichen Mechanismus zustande; d.h. jedes Mal kommt es durch Steigerung der G-6-P-ase zu einer Hemmung der Glukose-Aufnahme.

Nach unserer Meinung kann man diese Erscheinung folgendermaßen interpretieren: 1 Std. nach dem Insulinstoß von 10 E ist eine große Menge Insulin aus der Subcutis resorbiert und über die Lymphgefäße in die Blutbahn gelangt. Es wird jetzt mit dem Blut in s ä m t l i c h e Körpergewebe, also auch in gut durchblutete Muskulatur, wie das Zwerchfell, in genügender Konzentration eingeschwenkt, so daß es hier direkt auf die Muskelzelle einwirken kann. Hier entfaltet es seine "synthesefördernde Wirkung", wie die Ergebnisse deutlich zeigen, durch Hemmung der G-6-P-ase, der Bernsteinsäuredehydrogase und der ATP-ase.

Es ist einleuchtend, daß es vor allem die Hemmung der G-6-P-ase ist, wodurch der Glukosedurchsatz erhöht wird.

Daß dabei die Hexokinase als ein Plasmaferment weniger beeinflußt wird, könnte man sich damit erklären, daß die synthesefördernde Wirkung des Insulins an die Funktion der Atmungsfermente (s.S.) und damit an die Zellpartikel gebunden ist.

Wie die Versuche von I n g l e u.M. (36) zeigten, in denen die Wirkung der Muskularbeit auf den Blutzuckerspiegel diabetischer Ratten untersucht wurde, ist der oben geschilderte Insulineffekt unter physiologischen Bedingungen für eine Beschleunigung der Glukose-Aufnahme nicht notwendig. Obwohl I n g l e diesen Effekt "restlichen Insulinmengen im Gewebe" zuschrieb, sind wir der Ansicht, daß ein erhöhter "Sog" zur Atmungskette, der durch den ATP-Ver-

brauch bei der Muskularbeit hervorgerufen wird, ebenso den Glukosedurchsatz vermehren kann wie die oben geschilderte "synthesefördernde Wirkung" des Insulins.

Unter dem erhöhten "Sog" ist hier die gerichtete Verschiebung des stationären Stoffwechselzustandes zu verstehen, die durch die Verminderung der ATP-Konzentration in Richtung Atmungskette erfolgt.

Nach 1 mg SH-Glutathion steigt in der kurzen Zeit von 20 Min. die Glukose-Aufnahme stärker an als 1 Std. nach Insulin, während dabei die G-6-P-ase-Aktivität unverändert bleibt.

Diese Wirkung des SH-Glutathion könnte man mit dem Effekt der Muskularbeit vergleichen. Anscheinend aktiviert es in dieser niedrigen Dosierung die SH-empfindlichen Fermente der Atmungskette und des C₄-Carbonsäure-Zyklus in den Mitochondrien, was ja auch deutlich an der Steigerung der Bernsteinsäuredehydrase des Zwerchfells zutage tritt, während die Stimulierung der G-6-P-ase verzögert auftritt.

Einleuchtender scheint noch folgende Überlegung zu sein: Nach Versuchen von L a m p r e c h t (56) wird die Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrase spezifisch durch SH-Glutathion aktiviert, und zwar in dem Maße, daß sie in einem glutathionfreien Medium inaktiv ist.

Daher scheint gerade dieses Ferment besonders geeignet zu sein, auf eine minimale SH-Glutathion-Dosis (1 mg/20 Min.) anzusprechen.

Damit wäre der Angriffspunkt der niedrigen SH-Glutathion-Dosis an der äußerst glutathionempfindlichen Triose-Phosphat-Dehydrase (Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrase) zu suchen.

Es ist in der Tat sehr leicht denkbar, daß durch Stimulierung der Brenztraubensäurebildung der Sog zum Triosephosphat erhöht wird, was einem schnelleren Umsatz des durch die Hexokinasereaktion gebildeten G-6-P in Richtung Glykolyse gleich kommt. Die Angriffsmöglichkeit der G-6-P-ase wird dadurch eingeschränkt. Erst nach längerer Einwirkungszeit des SH-Glutathion bzw. bei höherer Dosierung scheint die Aktivierung der Phosphatase soweit fortgeschritten zu sein, daß trotz der Beschleunigung der Triosephosphatdehydratierung nur wenig G-6-P weiter umgesetzt werden kann.

Unter physiologischen Bedingungen setzt das Insulin aus der Leber Glutathion frei und kann dadurch indirekt die Glukoseutilisation in der Muskelzelle ermöglichen.

Auf diese Weise lassen sich auch die weiteren Ergebnisse erläutern: Nach 3 1/2 Stunden ist die Hauptmenge des Insulins aus dem Blut in die Leber geschwemmt, ja sogar dort aktiv angereichert worden, wie dies die Versuche mit C^{14} -Insulin gezeigt haben (18). Hier entfaltet es seine "synthesefördernde Wirkung", die an der Hemmung der Bernsteinsäure-Dehydrase und ATP-ase deutlich wird und setzt in dieser unphysiologisch hohen Konzentration eine große Menge Glutathion frei.

An der Peripherie wird durch diese hohe Glutathion-Konzentration die G-6-P-ase so aktiviert, daß die G-6-P-Bildung von der Deosphorylierung überwogen und deshalb der Glukosedurchsatz zur Brenztraubensäure und damit zu den Mitochondrien unterbunden wird.

Auf gleiche, nur eben direkte Weise, könnte auch die Wirkung einer Glutathion-Dosis von 16 mg/90 Min. zustandekommen.

VI. Zusammenfassung

Es wurden die Veränderungen verschiedener Fermentaktivitäten in Leber und Zwerchfell und der Glukose-Aufnahme durch isoliertes Zwerchfell nach subkutaner Insulin- bzw. Glutathion-Verabreichung untersucht.

- 1.) Nach 10 E Insulin sinkt die G-6-P-ase-Aktivität innerhalb von 60 Min. im Zwerchfell um 42 % ab und steigt in den folgenden 150 Min. um 76 % über den Normalwert. Dagegen ist die Glukose-Aufnahme nach 1 Std. gesteigert und nach 3 1/2 Std. gehemmt.

Es besteht demnach eine zeitliche Beziehung zwischen der Änderung der G-6-P-ase-Aktivität und der Glukose-Aufnahme unter Insulin-Wirkung.

- 2.) SH-Glutathion hat in Zwerchfell in einer Dosis von 1 mg innerhalb von 20 Min. keine Wirkung auf die G-6-P-ase-Aktivität. Dagegen ist nach 16 mg innerhalb von 90 Min. eine signifikante Stimulierung zu beobachten.

Die Glukose-Aufnahme steigt nach 1 mg SH-Glutathion innerhalb von 20 Min. deutlich an und ist nach 16 mg innerhalb von 90 Min. gehemmt.

Es besteht keine zeitliche Beziehung zwischen der G-6-P-ase-Aktivität und der Änderung der Glukose-Aufnahme nach 1 mg SH-Glutathion/20 Min. Doch ist diese Beziehung bei der Einwirkung von 16 mg Glutathion/90 Min. deutlich ausgeprägt.

- 3.) Die Leber-G-6-P-ase zeigt nach 10 E Insulin weder nach 1 Std. noch nach 3 1/2 Std. eine ausgeprägte Änderung. Dagegen spricht sie auf SH-Glutathion nach 1 mg/20 Min. und nach 16 mg/90 Min. mit einer deutlichen Steigerung an.

Parallel zu der Steigerung der Leber-G-6-P-ase durch 1 mg SH-Glutathion/20 Min. verläuft ein gut ausgeprägter Blutzucker-Anstieg.

- 4.) Die Bernsteinsäuredehydrase ist nach 10 E Insulin in Zwerchfell parallel zur G-6-P-ase nach 1 Std. gehemmt und nach 3 1/2 Std. gesteigert. Dagegen wird eine deutliche Verstärkung der Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität schon nach 1 mg SH-Glutathion/20 Min. erreicht. Nach 16 mg/90 Min. ist dieser Effekt noch ausgeprägter. Die Bernsteinsäuredehydrase spricht als ein Ferment des C₄-Tricarbonsäure-Zyklus viel empfindlicher auf SH-Glutathion an als die G-6-P-ase.

5.) In der Leber tritt im Gegensatz zum Zwerchfell nach 10 E Insulin sowohl nach 1 Std. als auch nach 3 1/2 Std. eine Hemmung der Bernsteinsäuredehydrase auf, die nach 3 1/2 Std. deutlich ausgeprägt ist.

Nach 1 mg Glutathion/20 Min. und nach 16 mg Glutathion/90 Min. wird eine Tendenz zur Steigerung der Leber-Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität sichtbar, die jedoch nicht signifikant ist.

6.) In Testversuchen wurde festgestellt, daß sich die ATP-ase in Zwerchfell und Leber zu den übrigen untersuchten Fermentaktivitäten parallel verhält, d.h. 1 Std. nach 10 E Insulin im Zwerchfell eine Hemmung, nach 3 1/2 Std. eine Aktivierung und nach 3 mg SH-Glutathion/90 Min. ebenfalls eine Steigerung ihrer Aktivität zeigt.

In der Leber ist sie schon 1 Std. nach 10 E Insulin gehemmt, ebenso nach 3 1/2 Std.

Wie die Bernsteinsäuredehydrase ist die ATP-ase in der Leber durch Glutathion nicht beeinflussbar.

7.) Die Insulinwirkung im Zusammenhang mit den insulinähnlichen Wirkungen des SH-Glutathion wird diskutiert.

VI. Summary

The investigations covered changes in various enzyme activities in the liver and diaphragm, and the absorption of glucose by the isolated diaphragm following subcutaneous administration of insulin and glutathione.

1. Following 10 units of insulin, G-6-P-ase (glucose-6-phosphatase) activity in the diaphragm falls off within 60 minutes by 42 % and increases in the ensuing 150 minutes by 76 % above normal level. On the other hand, glucose absorption is increased after 1 hour and inhibited after 3 1/2 hours.

Accordingly, there is a time relation between the change in the G-6-P-ase activity and the glucose absorption under the influence of insulin.

2. A dose of 1 mg of SH-Glutathione in the diaphragm has no effect within 20 mins. on the G-6-P-ase activity. By contrast, after 16 mg a significant stimulation can be observed within 90 minutes.

After 1 mg of SH-glutathione, glucose absorption increases perceptibly within 20 mins., and after 16 mg. is inhibited within 90 minutes.

There is no time relation between the G-6-P-ase activity and the change in glucose absorption after 1 mg. SH-glutathione/20 mins. But this relation is clearly marked in the case of 16 mg. glutathione/90 mins.

3. There is no marked change in the liver G-6-P-ase following 10 units of insulin either after 1 hr. or 3 1/2 hrs. By contrast, there is a clear reaction to SH-glutathione after 1 mg./ 20 mins. and 16 mg. / 90 mins.

A clearly demonstrable blood sugar increase runs parallel to the liver G-6-P-ase increase resulting from 1 mg. SH-glutathione after 20 mins.

4. After 10 units of insulin in the diaphragm succinic dehydrogenase runs parallel to G-6-P-ase, being inhibited after 1 hr. and increased after 3 1/2 hrs. On the other hand, a clear intensification of succinic dehydrogenase activity is attained with only 1 mg. SH-glutathione after 20 mins. After 16 mg. and 90 mins., these effect is even more marked. Succinic dehydrogenase, an enzyme of the C₄-tricarboxylic acid cycle, reacts much more sensitively to SH-glutathione than does G-6-P-ase.

5. In the liver, unlike the diaphragm, following 10 units of insulin there is an inhibition of succinic dehydrogenase after both 1 hr. and 3 1/2 hrs, which is clearly marked after 3 1/2 hrs.

After 1 mg. glutathione / 20 mins. and after 16 mg. glutathione / 90 mins., a tendency towards increased liver succinic dehydrogenase activity is observable, but the increase is not significant.

6. It was established in test experiments that in both diaphragm and liver ATP-ase activity runs parallel to the other enzyme activities investigated, i.e., inhibition 1 hr. after 10 units of insulin in the diaphragm, and intensification after 3 1/2 hrs.; and likewise increased activity after 3 mg. SH-glutathione and 90 mins.

In the liver there is already inhibition 1 hr. after 10 units of insulin, and likewise after 3 1/2 hrs.

Like succinic dehydrogenase, in the liver ATP-ase cannot be influenced by glutathione.

7. The effect of insulin is discussed in connection with the insulin-like effects of SH-glutathione.

VII. Literaturverzeichnis

- 1.) Krah1, M.E. und C.F. Cori: J. biol. Chem. 170, 607 (1947)
- 2.) Park, C.R. und M.E. Krah1: J. biol. Chem. 181, 247 (1949)
- 3.) Villee, C.H. und A.B. Hastings: J. biol. Chem. 179, 673 (1949)
- 4.) Perlmutter, M. und O.R. Greep: J. biol. Chem. 174, 915 (1948)
- 5.) Stadie, W.C., N. Haugaard und I.B. Marsh: J. biol. Chem. 198, 785 (1952)
- 6.) Whitney, I.E. und F.G. Young: Biochem. J. 66, 648 (1957)
- 7.) Vallence-Owen, J. und F.D.W. Lukens: Endocrinology 60, 625 (1957)
- 8.) Sols, A. und R.K. Crane: J. biol. Chem. 206, 925 (1954)
- 9.) Lindley, H.: J. Amer. Chem. Soc. 77, 4927 (1955)
- 10.) Ottaway, I.H.: Brit. med. J. 4832, 357 (1953)
- 11.) Ottaway, I.H.: Nature (London) 167, 1064 (1951)
- 12.) Chari, A. und E. Wertheimer: Nature (London) 171, 44 (1953)
- 13.) Brüggemann, Jhs., J. Schole und H. Karg: Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chem. 302, 36 (1955)
- 14.) Long, C.: Biochem. J. 50, 407 (1951)
- 15.) Elgee, N.J. und R.H. Williams: J. clin. Invest. 33, 1252 (1954)
- 16.) Haugaard, N. und M. Vaughan: J. Biol. Chem. 206, 549 (1954)
- 17.) Kallee, E. und G. Seybold: Ztschr. Naturforsch. 96, 307 (1954)
- 18.) Lee, N.D. und R.H. Williams: Endocrinology 54, 5 (1954)
- 19.) Brüggemann, Jhs., J. Schole und H. Karg: Hoppe-Syler's Ztschr. f. physiol. Chem. 302, 41 (1955)
- 20.) Bouckaert, J.P. und Chr. de Duve: Physiol. Rev. 27, 48 (1947)
- 21.) Dunn, D.F., B. Friedmann, K. Maass und G. Reichard: J. biol. Chem. 225, 225 (1957)
- 22.) Wall, J.S., R. Steele, D. de Bede und N. Altszuler: Amer. J. Physiol. 189, 43 (1957)

- 23.) Gregory, P.W. und H. Goss: Growth 3, 159 (1939)
- 24.) Nath, M.C., V.G. Hatvalue und J.S. Gadgil: Biochem. J. 53, 479 (1953)
- 25.) Patterson, I.W.: J. biol. Chem. 183, 81 (1950)
- 26.) Collins-Williams, J., A.E. Renold und A. Marble: Endocrinology 46, 1 (1950)
- 27.) Conn, I.W., L.H. Louis, M.W. Johnston, B. Johnson, J. Blood und E. Pinkham: J. lab. clin. Med. 34, 255 (1949)
- 28.) Lazarew, A. und J. Berman: Anat. Rec. 106, 215 (1950)
- 29.) Binkley, F., G. M. Christensen und F.C. Wu: J. biol. Chem. 192, 29 (1951)
- 30.) Manni, E.: Boll. Soc. ital. Biol. speriment 28, 351 (1952)
- 31.) Ashmore, J., A.B. Hastings und F.B. Nesbett: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 40, 673 (1954)
- 32.) Wick, A.N., D.R. Drury, R.W. Bancroft und E.M. Mac Kay: J. biol. Chem. 188, 241 (1951)
- 33.) Ingle, D.J., I.E. Necamis und M.C. Prestrud: Amer. J. Physiol. 149, 489 (1947)
- 34.) Lang, St., M.S. Goldstein und R. Levine: Amer. J. Physiol. 177, 447 (1954)
- 35.) Schöle, J., H. Karg und R. Genewein: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 308, 91 (1957)
- 36.) Martinez, C.: Acta physiol. lat.amer. 1, 135 (1951)
- 37.) Tomizawa, M.L. Nutley, H.T, Narahara und R.H. Williams: J. biol. Chem. 214, 285 (1955)
- 38.) Ingle, D.J., I.E. Nezamis und E.H. Morley: Amer. J. Physiol. 165, 469 (1951)
- 39.) Schöle, J.: Unveröffentlichte Versuche
- 40.) Appel, W. und K.I. Hansen: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 297, 49 (1954)
- 41.) Griffin, A.C., J.M. Luck, V. Kulakoff und M. Mills: J. biol. Chem. 209, 387 (1954)

- 42.) Lawrence, R.T.B., J. Salter und C.H. Best: Brit. med. J. 4885, 437 (1954)
- 43.) Milman, A.E., P. de Moor und F.C.W. Lukens: Amer. J. Physiol. 166, 354 (1951)
- 44.) Ingle, D.J., M.C. Prestrud und I.E. Nezamis: Amer. J. Physiol. 150, 682 (1947)
- 45.) Frame, E.G. und J.A. Russel: Endocrinology 39, 420 (1946)
- 46.) Brady, R.O. und S. Gurin: J. biol. Chem. 186, 461 (1950)
- 47.) Osborn, M.J. und J.L. Chaikoff: J. biol. Chem. 193, 549 (1951)
- 48.) Copenhaver, J.H., E.G. Shipley und R.K. Meyer: Arch. Biochem. 34, 360 (1952)
- 49.) Laugdon, R.O. und D.R. Weekley: J. biol. Chem. 214, 167 (1955)
- 50.) Ashmore, B.A., B. Hastings, F.B. Nesbitt und A.E. Renold: J. biol. Chem. 218, 77 (1956)
- 51.) Allegretti, N. und G.: Arch. int. Pharmacodyn. am. Therap. 91, 350, 412 (1952)
- 52.) Allegretti, N. und G. Bukadinovic: Amer. J. Physiol. 177, 264 (1954)
- 53.) Bacchus, H. und M.H. Heiffer: Amer. J. Physiol. 176, 262 (1954)
- 54.) Funk, F.: Vet. med. Diss. München 1957
- 55.) Johanson, R.: Nature (Lond.) 171, 176 (1953)
- 56.) Linder, A.: "Planen und Auswerten von Versuchen" Verlag Birkhäuser, Basel 1953
- 57.) Lamprecht, W.: Persönliche Mitteilung

Herrn Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e -
m a n n danke ich besonders für die Überlassung
des Themas und die Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. S c h o l e gilt mein besonderer Dank
für stets gewährte Diskussionen.

Lebenslauf

Am 22. Januar 1931 wurde ich als Sohn des Landwirts Karl Schumacher und seiner Ehefrau Elsa, geb. Stiber, in Kirchheim (Teck) in Wttbg. geboren.

Nach 5jähriger Grundschulzeit am Heimatort Weilheim (Teck) trat ich im Jahre 1943 in das Realgymnasium in Kirchheim (Teck) ein. Dort legte ich 1952 das Abitur ab.

Zunächst studierte ich ein Semester Medizin an der Universität Tübingen. Im Winter-Semester 52/53 nahm ich mein Studium der Tiermedizin an der Universität München auf, wo ich im Januar 1957 die tierärztliche Prüfung ablegte.

